

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Efecto de la restricción calórica, el
envejecimiento y el componente graso de la
dieta sobre la señalización apoptótica en
tejidos mitóticos y postmitóticos de ratón**

José Alberto López Domínguez

Córdoba 2013

TITULO: *Efecto de la restricción calórica, el envejecimiento y el componente graso de la dieta sobre la señalización apoptótica en tejidos mitóticos y postmitóticos de ratón*

AUTOR: *JOSÉ ALBERTO LÓPEZ DOMÍNGUEZ*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

Programa de Doctorado en Biomedicina



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Efecto de la restricción calórica, el
envejecimiento y el componente graso de la
dieta sobre la señalización apoptótica en
tejidos mitóticos y postmitóticos de ratón**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **José Alberto López Domínguez**,
Licenciado en Biología, para optar al grado de **Doctor en Ciencias**.

Los Directores

Dr. José Manuel Villalba Montoro
Catedrático de Biología Celular
Universidad de Córdoba

Dra. María Isabel Burón Romero
Catedrática de Biología Celular
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 11 de febrero de 2013



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

D. José Manuel Villalba Montoro y D^a. María Isabel Burón Romero, Doctores en Ciencias y Catedráticos de Universidad del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que José Alberto López Domínguez, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “**Efecto de la restricción calórica, el envejecimiento y el componente graso de la dieta sobre la señalización apoptótica en tejidos mitóticos y postmitóticos de ratón**”, que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firman el presente INFORME en Córdoba, a 11 de febrero de 2013

Fdo.: José Manuel
Villalba Montoro

Fdo.: María Isabel
Burón Romero



TÍTULO DE LA TESIS:

Efecto de la restricción calórica, el envejecimiento y el componente graso de la dieta sobre la señalización apoptótica en tejidos mitóticos y postmitóticos de ratón

DOCTORANDO:

José Alberto López Domínguez

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, llevada a cabo principalmente entre los años 2009 y 2012, el doctorando José Alberto López Domínguez ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma. Gracias a su trabajo se ha puesto de manifiesto el papel fundamental que el componente graso de la dieta en restricción calórica juega en la regulación de la muerte celular en hígado y músculo esquelético, dos modelos de tejidos (mitótico y postmitótico, respectivamente) de gran relevancia en biogerontología. Así, se ha comprobado cómo el consumo de una dieta rica en ácidos grasos $\omega 3$ en restricción calórica determina el establecimiento de un ambiente celular anti-apoptótico en el músculo esquelético de ratones jóvenes que, no obstante, se pierde durante el envejecimiento. En animales viejos es una dieta rica en ácidos grasos saturados y monoinsaturados bajo condiciones de restricción calórica, la que ofrece unos mejores resultados en la preservación de la fisiología de los dos tejidos bajo estudio. Este trabajo se ha desarrollado en el ámbito de dos Proyectos Internacionales financiados por el NIH norteamericano y la Junta de Andalucía, y un Proyecto del Plan Nacional, en los cuales, desde una perspectiva más amplia, se ha investigado de qué manera el componente graso de la dieta en restricción calórica es un factor determinante de los efectos que tiene esta intervención de la dieta incrementando la longevidad y permitiendo un envejecimiento saludable. Con relación al trabajo desarrollado en su Tesis, se han realizado publicaciones en revistas de primera línea en el campo de la Biogerontología como *Age* y *Journal of Gerontology Biological Sciences*. Otros artículos se encuentran en fase de preparación. Su formación se ha completado con la realización de colaboraciones de investigación y docentes, y la realización de dos estancias cortas en la Universidad de California en Davis (Estados Unidos). Por último, el doctorando ha realizado aportaciones en congresos de ámbito nacional e internacional. Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 8 de febrero de 2013

Firma de los directores

Fdo.: José Manuel Villalba Montoro

Fdo.: María Isabel Burón Romero

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. José Manuel Villalba Montoro y María Isabel Burón Romero. El trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación 1R01AG028125-01A1 (NIH, Estados Unidos), BFU2011-23578 (Ministerio de Economía y Competitividad) y P09-CVI-4887 (Junta de Andalucía), así como por el programa Proyectos Internacionales (Junta de Andalucía) y por el grupo de investigación BIO-276 ("Biomembranas, Antioxidantes y Estrés oxidativo", Junta de Andalucía y Universidad de Córdoba). El doctorando recibió ayudas del programa nacional de Formación de Profesorado Universitario, (Ministerio de Educación), del programa Proyectos Internacionales (Junta de Andalucía) y del P09-CVI-4887 (Junta de Andalucía).

“Llegará una época en que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoráramos cosas que para ellos son tan claras. Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar.”

Séneca, *Cuestiones naturales*

Acrónimos usados

AA	Ácido araquidónico
ACP	Proteína portadora de acilos
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de la apoptosis
AL	<i>Ad libitum</i>
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Trifosfato de adenosina
BH	Dominio de homología con Bcl-2
BIR	Dominio repetido IAP de baculovirus
CARD	Dominio activador y reclutador de caspasas
CD95	FasR, receptor de Fas (<i>cluster of differentiation 95</i>)
CE	Enzima condensante
cFLIP	Proteína celular inhibidora de FLICE
CLAP	Quimostatina, leupeptina, antipaína y pepstatina
COX	Ciclooxigenasa o prostaglandina-endoperóxido sintasa
CPM	Cuentas por minuto
CR	Restricción calórica
DBI	Índice de dobles enlaces
DED	Dominios efectores de muerte
DISC	Complejo señalizador inductor de muerte
DHA	Ácido docosahexaenoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ER	Retículo endoplásmico
FADD	Proteína con dominio de muerte asociada a Fas
FLICE	Enzima convertidora de IL-1 β similar a FADD
HCC	Carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HSP	Proteína de choque térmico
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados

IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
IMS	Espacio intermembrana mitocondrial
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
LA	Ácido linoleico
LNA	Ácido inolénico
LOX	Lipooxigenasa
LT	Leucotrieno
MAC	Canal mitocondrial inducido por apoptosis
MOM	Membrana externa mitocondrial
MPT	Transición de permeabilidad mitocondrial
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NOD	Dominio de unión a nucleótidos y de oligomerización
nSMase	Esfingomielinasa neutra
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PARP-1	Poli-(ADP-ribosa)-polimerasa 1
PG	Prostaglandina
PLA2	Fosfolipasa A2
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTP	Poro de transición de permeabilidad
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SFA	Ácidos grasos saturados
SM	Esfingomielina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis similar a TNF
TUNEL	Marcaje del extremo libre con dUTP mediante desoxittransferasa terminal
XIAP	Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X

Índice

SUMMARY	1
RESUMEN	7
PREFACIO	14
INTRODUCCIÓN	16
1. Envejecimiento	17
1.1 Teoría del envejecimiento por radicales libres.....	18
1.2 Teoría del envejecimiento en función de la composición lipídica de las membranas celulares.....	19
2. Restricción calórica	20
2.1 Restricción calórica y producción de especies reactivas de oxígeno	22
2.2 Restricción calórica y grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas celulares.....	22
3. Ácidos grasos y sus funciones biológicas	23
3.1 Ácidos grasos.....	23
3.2 Acilgliceroles	24
3.3 Fosfolípidos.....	24
3.4 Membrana plasmática: estructura y funciones	25
3.5 Incorporación de ácidos grasos de la dieta.....	26
3.6 Biosíntesis de los ácidos grasos	27
3.7 Ácidos grasos esenciales: metabolismo de las series n-3 y n-6	28
3.8 Lípidos eicosanoides y funciones biológicas de los derivados de los PUFA.....	30
4. Apoptosis	32
4.1 Aspectos generales	32
4.2 Caspasas	35
4.2.1 Caspasas-8 y -10.....	36
4.2.2 Caspasa-3 y otras caspasas efectoras	37
4.3 Familia de proteínas Bcl-2.....	38
4.3.1 Bcl-2	39
4.3.2 Bax	40
4.3.3 Bid	41
4.3.4 Otros miembros de la familia Bcl-2	41
4.4 Permeabilización de la membrana externa mitocondrial	42
4.4.1 Poro de transición de permeabilidad.....	43
4.4.2 Canal mitocondrial inducido por apoptosis.....	43
4.4.3 Liberación bifásica de citocromo <i>c</i>	45
4.5 El apoptosoma	45
4.5.1 Citocromo <i>c</i>	45
4.5.2 Apaf-1	45
4.5.3 Caspasa-9.....	46
4.6 Otras proteínas reguladoras de la apoptosis	47
4.6.1 Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs).....	47
4.6.2 Smac/Diablo.....	48
4.6.3 HtrA2/Omi.....	48

4.6.4 Hsp70 y otras proteínas de choque térmico.....	49
4.7 La apoptosis independiente de caspasas.....	50
4.7.1 Factor inductor de la apoptosis (AIF).....	50
4.7.2 Endonucleasa G.....	51
4.8 Enzimas con actividad esfingomielinasa y apoptosis.....	52
4.8.1 Esfingomielinasas neutras y coenzima Q.....	54
4.9 Ácidos grasos poliinsaturados y apoptosis.....	54
5. Músculo esquelético y envejecimiento.....	56
5.1 Histología.....	56
5.2 Inervación y contracción.....	57
5.3 Tipos de fibras musculares esqueléticas.....	57
5.4 Modelo de enfermedad vinculada al envejecimiento en un órgano postmitótico: la sarcopenia...58	
5.4.1 Mecanismos de la degeneración muscular: apoptosis mionuclear.....	59
6. Hígado y envejecimiento.....	61
6.1 Modelo de enfermedad vinculada al envejecimiento en un órgano proliferativo: carcinoma hepatocelular.....	61
HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
Animales y dietas.....	67
Obtención de las muestras.....	69
Técnicas de fraccionamiento celular.....	69
<i>Aislamiento de membrana plasmática de músculo esquelético.....</i>	<i>69</i>
<i>Aislamiento de membrana plasmática de hígado.....</i>	<i>70</i>
Determinación de la concentración de proteína en las muestras.....	72
Determinación de los niveles de proteínas vinculadas a la apoptosis: Bax, Bcl-2, XIAP, Hsp70, AIF y citocromo c.....	72
<i>Preparación de muestras.....</i>	<i>72</i>
<i>Electroforesis.....</i>	<i>72</i>
<i>Transferencia y control de carga.....</i>	<i>73</i>
<i>Inmunotinción y revelado.....</i>	<i>73</i>
<i>Cuantificación.....</i>	<i>74</i>
Análisis de la pureza de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática.....	74
Ensayo de la actividad esfingomielinasa neutra.....	76
Ensayo de actividad de las caspasas -8, -9 y -3.....	76
Extracción de compuestos quinónicos.....	77
Cuantificación de coenzima Q en HPLC.....	77
Extracción de lípidos de membrana plasmática.....	78
Análisis de los ácidos grasos de la membrana plasmática.....	78
Determinación del índice apoptótico mediante ELISA.....	79
Análisis estadístico y representación.....	79

RESULTADOS	82
Peso de los ratones tras las diferentes intervenciones dietéticas	83
Efectos de las intervenciones dietéticas y el envejecimiento sobre el músculo	84
Obtención de fracciones enriquecidas en sarcolema.....	84
Composición de la membrana plasmática: análisis de ácidos grasos.....	84
Contenido de coenzima Q en la membrana plasmática.....	90
Actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio.....	93
Índice apoptótico.....	94
Niveles de proteínas de la familia Bcl-2.....	94
Liberación al citosol de AIF y citocromo <i>c</i>	98
Niveles de XIAP.....	100
Actividades proteasa vinculadas a la apoptosis.....	101
Efectos de las intervenciones dietéticas y el envejecimiento sobre el hígado	103
Obtención de fracciones enriquecidas en membrana plasmática.....	103
Composición de la membrana plasmática: análisis de ácidos grasos.....	104
Contenido de coenzima Q en la membrana plasmática.....	109
Actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio.....	111
Índice apoptótico.....	112
Niveles de proteínas de la familia Bcl-2.....	113
Liberación al citosol de AIF y citocromo <i>c</i>	116
Niveles de Hsp70.....	118
Niveles de XIAP.....	119
Actividades proteasa vinculadas a la apoptosis.....	120
DISCUSIÓN	122
Efectos de las intervenciones dietéticas sobre la señalización apoptótica en el músculo	123
Restricción calórica y señalización apoptótica en animales jóvenes.....	123
Efecto de la grasa de la dieta en animales jóvenes.....	125
Apoptosis muscular y envejecimiento en una dieta <i>ad libitum</i> con aceite de soja.....	129
Efecto de la restricción calórica sobre los cambios debidos al envejecimiento.....	132
Influencia del componente graso de la dieta en la señalización apoptótica con el envejecimiento ..	134
Efecto de las intervenciones dietéticas sobre la señalización apoptótica en el hígado	139
Diferencias en la señalización apoptótica con la edad en una dieta <i>ad libitum</i> con aceite de soja.....	139
Efecto de la restricción calórica sobre la señalización apoptótica hepática.....	144
Alteraciones en la señalización apoptótica hepática en función del tipo de componente graso en dietas de restricción calórica.....	147
Discusión general y perspectivas	152
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	153
BIBLIOGRAFÍA	155

SUMMARY

Effects of calorie restriction, aging and dietary fat source on apoptotic signalling in murine mitotic and post-mitotic tissues

Introduction

Aging is associated to a wide variety of related diseases, such as degenerative and neoplastic disorders. Multiple theories explaining the aging process have been suggested being the free radical theory of aging the most accepted and studied one. According to this theory, oxygen-derived free radicals generation due to metabolic processes is responsible for the progressive damage of proteins, lipids and nucleic acids. In addition, a membrane theory of aging has been suggested, stating that the degree of unsaturation in membrane lipids partially determine the maximum life span in species-based comparisons .

Calorie restriction without malnutrition is the best established dietary intervention able to extend medium and maximum life span in several model organisms, including mammals. CR delays the onset of the vast majority of age-related diseases, such as cancer, neurodegenerative diseases, sarcopenia of aging, or diabetes. This intervention has been also proven to alter the degree of unsaturation of lipids in cellular membranes, decreasing the double bond index. The extent to which modifications in membrane structure and membrane-bound activities mediate the effects of calorie restriction still requires further investigation to be better understood.

Fatty acids are present in phospholipids, the main structural constituent of cell membranes, as well as in acylglycerols, as energy reservoirs. The length and degree of unsaturation of the aliphatic chain determine the structural and biological characteristics of the biological membranes. Additionally, long-chain polyunsaturated fatty acids belonging to n-6 and n-3 series are responsible for a wide range of biological processes. Arachidonic acid-derived eicosanoids are able to induce several processes linked to inflammation. On the other hand, n-3 fatty acids contribute to regulate these proinflammatory stimuli in several different ways (including competitive inhibition and direct antiinflammatory action). It has been described that n-3 fatty acids are able to increase cell death rates in tumors, and to prevent degeneration in the nervous tissue. In summary, calorie restriction and dietary lipids contribute to modify biological membranes, which apart from being a passive target for oxidative damage, contain biologically active fatty acids.

Some of the main age-related diseases have been proven to be tightly linked to imbalance between cell proliferation and death. Apoptosis, or programmed cell death, is required for several stages of development and contributes to maintain homeostasis. Insufficient apoptosis is detected in tumors, while an excessive cell death rate causes loss of function in non-mitotic tissues, as observed in nervous tissue and skeletal muscle. Apoptosis is regulated through complex integration of survival and death signals from inside and outside the cell. In the extrinsic pathway, extracellular ligands bind

plasma membrane receptors and activate a signalling cascade resulting in DNA condensation and fragmentation, organelle dismantling and cell shrinkage and blebbing. In the intrinsic or mitochondrial pathway, the same result is achieved after detection of DNA damage or other cellular insults. Imbalance between proapoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 protein family will determine the release of mitochondrial intermembrane space proteins, as a result of outer membrane permeabilization, activating effector proteases and endonucleases, and ultimately causing cell death. A family of cysteine-dependent aspartate-directed proteases (caspases) participates in several stages of apoptotic signalling and execution. Several other proteins participate in apoptosis regulation. X-linked inhibitor of apoptosis is able to inhibit caspase activity. The apoptotic inducing factor (AIF) from the intermembrane space promotes cell death in a caspase-independent manner, together with endonuclease G. Ceramide, produced by neutral and acid sphingomyelinases, plays an important role as an apoptosis initiator. It has been demonstrated that coenzyme Q is able to inhibit neutral sphingomyelinase activity.

In skeletal muscle, apoptosis is one of the mechanisms of muscle fiber degeneration linked to sarcopenia of aging. Sarcopenia is defined as the loss of muscle mass and function with age, and fiber loss predominantly occurs among fast-contracting fibers. Due to the particular characteristics of muscle fibers, apoptosis in skeletal muscle usually consists in a selective death of myonuclei instead of dismantling of the whole cell. Calorie restriction prevents the age-linked increase of muscle apoptosis in rats, decreasing fiber wasting in a similar way as exercise does. In the liver, which exhibits high proliferative potential, apoptosis is able to control the increased risk of neoplastic disease with age. Anti-apoptotic proteins are overexpressed in the majority of the HCC cases, together with a decrease in proapoptotic proteins level.

Skeletal muscle and liver appear to be useful model tissues to achieve a better understanding about how dietary lipids and calorie restriction are able to regulate apoptotic processes in mitotic and postmitotic tissues, which account for an important role in the above mentioned age-linked diseases. Additionally, a calorie restriction model allows us to study the effect of several types of dietary fat sources, bypassing the negative effects of some of these sources in *ad libitum* diets.

Main objective

The aim of this work has been to analyse the role of calorie restriction and dietary fat on apoptotic signalling pathways in skeletal muscle and liver, together with the effect of aging. For this purpose, several apoptotic markers were analysed and a functional and structural characterisation of plasma membranes was also performed.

Materials and methods

Male C57BL/6 mice were fed a commercial rodent chow diet until they were 3 months old, being then randomly assigned into 4 dietary groups and fed a modified AIN-93G. In order to prevent obesity during the study, the control group was fed 95% of a pre-determined *ad libitum* intake. CR dietary groups were fed 40% less calories, these diets being identical except for dietary lipid sources, which were soybean oil (high in n-6 PUFAs, also for control *ad libitum* group), fish oil (high in n-3 PUFAs) or lard (high in saturated and monounsaturated fatty acids). The animals were sacrificed by cervical dislocation after 6 or 18 months of dietary intervention.

Skeletal muscle and liver samples were homogenized in specific buffers containing protease inhibitors. A small aliquot of the total homogenate was stored and samples were centrifuged at 350 x *g* for 10 min. The supernatant so obtained was centrifuged at 80,000 x *g* for 45 min to separate a cytosolic and a crude membrane fraction. Plasma membranes were extracted from the membranous crude fraction by two-phase partition (6-6.4% dextran and polythyleneglycol).

For membrane fatty acid analysis, lipids were extracted from the plasma membrane using Bligh-Dyer extraction. Fatty acid methyl esters were extracted with petroleum ether and water and stored frozen for separation and quantification by capillary gas chromatographic analysis.

Proteolytic activities of caspases-8, -9 and -3 were determined in a fluorometric assay, either in the presence or in the absence of specific inhibitors. Fluorescence signals were then recorded at wavelengths of 380 nm (excitation) and 460 nm (emission). DNA fragmentation (apoptotic index) in liver was quantified using the ELISA kit developed by Roche Diagnostics, which is based on the measurement of the amount of cytosolic mono- and oligonucleosomes derived from chromatin fragmentation.

For immunodetection of cell death-related proteins, an approximate amount of 50 µg protein was separated by SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes. Blots were stained with Ponceau S for visualization and quantification of protein lanes. Bax, Bcl-2 and XIAP polypeptides were measured in whole homogenates, while AIF, HSP70 and cytochrome *c* were measured in cytosolic fractions. Horseradish peroxidase activity was used to reveal binding sites by enhanced chemiluminescence.

Coenzyme Q levels were determined in plasma membrane-enriched samples. Coenzyme Q isoforms (CoQ₉ and CoQ₁₀) were extracted in hexane and, then the lipid extract was dissolved in methanol and used for quantification by reversed-phase HPLC separation.

Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase (nSMase) activity was assayed with purified plasma membranes. After the assay, in which a mixture of cold SM and [methyl-¹⁴C]-SM was used as a substrate, [¹⁴C]-phosphorylcholine was quantified using a liquid scintillation counter.

Results and discussion

As expected, skeletal muscle and liver exhibit differential responses to the dietary interventions, most likely due to their particular characteristics and metabolism.

With regard to lipid composition, both skeletal muscle and liver plasma membranes exhibit a highly saturated fatty acid profile and a stable content of monounsaturated fatty acids, while n-6 and n-3 PUFA content is dependent on the fat source. Arachidonic acid and main n-3 fatty acids (EPA, DHA) content in the membranes are associated in different ways with n-6/n-3 fatty acid ratio in the diets. Total PUFA content decreases both in skeletal muscle and in liver with aging. Fatty acids belonging to the n-3 series are almost absent in aged animals fed a CR-Lard diet, with minor tissue-dependent variations.

Regarding cell death processes in skeletal muscle, aging, calorie restriction or dietary fat source variations do not cause any apparent change in apoptotic index, measured as the amount of DNA fragmentation. Of note, previous studies developed in mice detected an increase of apoptotic index in 25-months old mice. Since our studies with old animals were developed at an age of 21 months (fed experimental diets for 18 months), this might indicate a late onset of sarcopenia of aging in mice, or at least, a later implication of apoptotic processes.

A detailed insight into the signalling cascade regulating skeletal muscle apoptosis in the different dietary groups shows an uncoupling between DNA fragmentation and activation of caspases -9, -8 and -3 activities. Aging does not affect caspases activity in the CR-Lard group, but results in partially increases of caspases activity in the CR-Soy group (significant changes were only observed for caspases -9 and -3). Finally, old mice from the CR-Fish group show significantly higher caspases activities than their young counterparts. AIF cytosolic levels, responsible for caspase-independent apoptosis, are the only parameter among those tested which correlate with apoptotic index. Previous studies in rats have suggested a more prominent role of caspase-independent apoptosis in aged skeletal muscle, instead of the classical caspase-dependent pathways.

According to our results, changes of Bcl-2/Bax ratio, which tend to diminish in a more proapoptotic cellular environment, show more dependency on dietary fat source than on aging or calorie restriction. Animals from the CR-Fish group have a higher Bcl-2/Bax ratio than those from CR-Lard. These diet-based variations affect mainly to Bax protein levels, whereas Bcl-2 remains basically unaltered among dietary groups, although exhibiting an increase with age in all of them.

In young mice, calorie restriction and dietary fat source have clear and consistent effects on apoptotic signalling, since mice fed under CR exhibit lower Bax protein levels, decreased levels of cytosolic cytochrome c and AIF, and lower sarcolemmal neutral sphingomyelinase (nSMase) activity. Among CR diets, lower levels of caspases -8 and -9 activity are found in skeletal muscle of mice from the CR-Fish group, together with higher coenzyme Q and decreased nSMase activity in plasma membranes, and lower Bax protein levels, when compared with the rest of CR groups. Consequently, a so called "anti-apoptotic environment" is generated by 6-months CR which is clearly enhanced by

including fish oil in the diet, even although this alterations in signalling cascades do not have a significant effect on DNA fragmentation levels or caspase-3 activity. However, changes in fiber cross-sectional area and circularity are observed in a parallel structural study performed in our group. A decrease in cross-sectional area and an increase in cross-sectional circularity may indicate a partial loss of integrity in muscle fibers. Significant changes in both parameters are detected with this sensitive technique (electron microscopy), correlating with the above mentioned trends and therefore indicating a subtle effect of calorie restriction and dietary fat on apoptotic cell death in young mice.

The mentioned “antiapoptotic environment” is not observed, however, among aged mice. Caspases activities exhibit inverse linear trends and the rest of the above mentioned changes are attenuated, as it is the case of sarcolemmal coenzyme Q₁₀ levels, or do not occur, as it is the case of cytosolic levels of AIF and cytochrome *c*.

In liver, apoptotic index shows significant alterations with age and dietary interventions. An increase of apoptosis with age is detected in all the dietary groups with the only exception of the CR-Lard group. A significant linear trend is also detected, by which dietary groups with a higher n-3/n-6 fatty acids ratio in the diet exhibit higher levels of apoptosis, both in 6-months and 18-months dietary interventions. Among the rest of parameters under study, none of them correlates exactly with apoptotic index. Hence, no direct mechanistic explanation can be inferred from the available data.

According to our results, calorie restriction has no significant effect on Bcl-2/Bax ratio. Again, no changes in this parameter are detected among CR diets with different fat sources in 6- or 18-month animals. Nevertheless, aging tends to lower Bcl-2/Bax ratio in all the experimental groups. In both AL-Soy and CR-Soy, Bcl-2/Bax ratio values are lower in old animals as an effect of diminished Bcl-2 protein levels, whereas CR-Lard and CR-Fish exhibit increased Bax levels with aging.

Cytosolic levels of cytochrome *c* are dramatically increased in aged liver of both AL and CR mice. Old animals fed on the CR-Lard diet exhibit a 10-fold higher level compared with their young counterparts, and significantly higher than those fed on the CR-Fish diet during 18 months. However, AIF does not share this pattern, and cytosolic levels of this protein decrease in old mice belonging to the CR-Soy group but not under the AL-Soy diet. A statistically non significant decrease is registered for the CR-Fish dietary group, and subsequently CR-Lard old mice present higher cytosolic AIF levels than the rest of CR mice. As a consequence, a direct correlation between caspase-independent cell death and apoptotic index in liver cannot be established.

Protein levels of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) are dramatically increased in aged AL-Soy animals, and CR reduces the extent of this increase. Caspases activities vary depending on age and dietary interventions. Calorie restriction inhibits caspases -3, -8 and -9 activities in young mice but not in old animals. In addition, aging tends to increase the activity of signalling caspases (-8 and -9) in the CR groups. Taken together, our data suggest a general increase of apoptotic signaling with age. Focusing on CR groups, caspase-8 activity is enhanced. In hepatocytes, extrinsic pathway needs to be amplified by the mitochondrial apoptotic machinery, which is consistent with the decrease of Bcl-

2/Bax ratio detected in our work. An increased release of cytochrome *c* and a higher caspase-9 activity are logical consequences of this imbalance, and the elevated XIAP protein levels may account for the unaltered or even diminished caspase-3 activity in aged animals.

In this scenario, the identification of the endonuclease enzyme responsible for DNA fragmentation detected in our work remains elusive. In some models, DNA fragmentation is a late event in apoptosis, taking place after phagocytosis. Additionally, a variety of regulatory proteins of multiple apoptosis pathways have not been included in our study and their roles in apoptotic signaling might be partially redundant with the studied caspase-dependent (caspase-3) and independent (AIF) DNA fragmentation inducers.

The physiological significance of the interesting absence of apoptosis induction in old mice from the CR-Lard group remains to be determined. An increase of cell death rate contributes to removal of potentially transformed hepatocytes, thus preventing neoplastic disease. However, recent investigations have proven an increased incidence of hepatic tumors in knockout mice for anti-apoptotic genes, and a decrease in mice not expressing proapoptotic proteins belonging to Bcl-2 family. Consequently, the actual role of cell death in carcinogenesis is currently under revision. Moreover, CR-Lard animals exhibited the highest maximum and mean longevity among the CR groups in a parallel longevity study using the same dietary interventions (Ramsey J.J., unpublished). Complementary work to study cancer incidence under these dietary interventions is in progress.

Introducción

El envejecimiento se asocia a diversas enfermedades, tales como desórdenes degenerativos y neoplasias. Se han sugerido múltiples teorías para explicar el proceso de envejecimiento, y la más aceptada y estudiada entre ellas es la teoría de los radicales libres. De acuerdo con ella, las especies reactivas de oxígeno producidas en los procesos metabólicos son responsables de la degradación progresiva de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Además, se ha propuesto una teoría del envejecimiento en función de la composición de las membranas, que sugiere una relación entre el grado de insaturación de los lípidos de membranas y la longevidad media de diversas especies.

La restricción calórica sin malnutrición es la intervención dietética mejor estudiada capaz de prolongar la longevidad media y máxima en diversos organismos modelo, incluyendo mamíferos. Además, retrasa la aparición de la mayor parte de las enfermedades vinculadas al envejecimiento, tales como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes o sarcopenia del envejecimiento. La restricción calórica también modifica el grado de insaturación de las membranas celulares, disminuyendo el índice de dobles enlaces. Son necesarias más investigaciones para comprender mejor en qué medida estas modificaciones de las membranas son un mecanismo de acción de la restricción calórica.

Los ácidos grasos están presentes en las células en forma de fosfolípidos, los principales constituyentes de las membranas celulares, así como en forma de acilgliceroles, sirviendo de reserva energética. La longitud y el grado de saturación de la cadena alifática determinan las características biológicas y estructurales de las membranas. Además, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga pertenecientes a las series n-3 y n-6 son responsables de un amplio espectro de procesos biológicos. Los eicosanoides derivados del ácido araquidónico inducen diversos procesos vinculados a la inflamación. Por otro lado, los ácidos grasos n-3 contribuyen a regular estos estímulos proinflamatorios mediante varios mecanismos, incluyendo la inhibición competitiva y la acción directa antiinflamatoria. Se ha descrito, además, que los ácidos grasos n-3 incrementan la tasa de muerte celular en tumores, y que previenen la degeneración del tejido nervioso. En resumen, la restricción calórica y los lípidos de la dieta contribuyen a modificar las membranas celulares, que además de ser elementos susceptibles de daño oxidativo contienen ácidos grasos biológicamente activos.

Algunas de las más importantes enfermedades vinculadas al envejecimiento se basan en el desequilibrio entre proliferación y muerte celular. La apoptosis, o muerte celular programada, es necesaria para diversas etapas del desarrollo y contribuye a mantener la homeostasis de los tejidos. En los tumores se detectan niveles insuficientes de muerte celular, mientras que una apoptosis excesiva puede provocar la pérdida de función en tejidos postmitóticos, como el nervioso o el muscular. La apoptosis es regulada a través de una compleja integración de señales de supervivencia y muerte procedentes del interior y del exterior de la célula. En la ruta extrínseca, ligandos extracelulares se

unen a receptores en la membrana plasmática, activando una cascada de señalización que desemboca en la condensación y fragmentación del ADN, el desmantelamiento de los orgánulos celulares y la contracción y fragmentación de la propia célula. En la ruta intrínseca, se llega al mismo resultado tras la detección de daño en el ADN o en otros componentes celulares. El desequilibrio entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 determina la liberación al citosol de diversas proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria, como resultado de la permeabilización de la membrana externa, activando proteasas efectoras y endonucleasas que llevan a la muerte celular. Una familia de proteasas dirigidas a aspartato y dependientes de cisteína (caspasas) participa en varios puntos de esta señalización, así como de la ejecución de la apoptosis. Otras proteínas participan en la regulación de la muerte celular, como el inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP), que inhibe la actividad de varias caspasas. El factor inductor de la apoptosis (AIF) del espacio intermembrana de la mitocondria promueve la muerte celular de una forma independiente de caspasas, junto con la endonucleasa G. La ceramida, producida por esfingomielinasas neutras y ácidas, juega un papel importante como iniciador de la apoptosis. Se ha demostrado que la coenzima Q inhibe la actividad esfingomielinasa neutra.

La apoptosis es uno de los mecanismos de degeneración de la fibra muscular esquelética vinculada a la sarcopenia del envejecimiento. La sarcopenia se define como la pérdida de masa y función muscular con la edad, y afecta principalmente a las fibras de contracción rápida. Debido a las características propias de las células musculares, la apoptosis consiste más en la pérdida selectiva de mionúcleos que en el desmantelamiento de la fibra completa. La restricción calórica previene el incremento de la apoptosis vinculado al envejecimiento en el músculo de ratas, disminuyendo la atrofia de una forma similar a como lo hace el ejercicio físico. En el hígado, un órgano con un alto potencial proliferativo, la apoptosis permite controlar la aparición de neoplasias, cuya incidencia aumenta con la edad. Diversas proteínas antiapoptóticas están sobreexpresadas en la mayoría de los casos de carcinoma hepatocelular, al tiempo que disminuyen los niveles de proteínas proapoptóticas.

El músculo esquelético y el hígado resultan, por tanto, modelos adecuados para alcanzar un mayor conocimiento acerca del modo en que la restricción calórica y los lípidos de la dieta regulan los procesos apoptóticos en tejidos mitóticos y postmitóticos, y su relevancia en las mencionadas enfermedades vinculadas al envejecimiento. Además, el modelo de restricción calórica nos permite estudiar el efecto de las grasas de la dieta evitando las consecuencias negativas que provocan en un contexto de ingesta *ad libitum*.

Objetivo principal

El objetivo de este trabajo ha sido analizar el papel de la restricción calórica y la grasa de la dieta sobre la señalización apoptótica en el músculo esquelético y el hígado, junto con los efectos del envejecimiento. Con este propósito, hemos analizado varios marcadores de apoptosis y hemos llevado a cabo una caracterización funcional y estructural de la membrana plasmática.

Materiales y métodos

Los ratones C57BL/6 fueron alimentados con una dieta commercial para roedores hasta tener tres meses de edad, momento en el cual fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos diferentes en función de su dieta, cuya base fue una dieta AIN-93G modificada. Para prevenir la obesidad durante el estudio, el grupo control fue alimentado con un 95% de la ingesta *ad libitum*, establecida de forma previa. Tres grupos fueron sometidos a un 40% de restricción calórica, con dietas idénticas salvo en la fuente de la grasa, que fue aceite de soja (*soybean oil*, rico en PUFA n-6 y también empleado en el grupo control), aceite de pescado (*fish*, rico en PUFA n-3) o manteca de cerdo (*lard*, rica en ácidos grasos saturados y monoinsaturados). Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical tras 6 o 18 meses de intervención dietética.

Muestras de músculo esquelético y de hígado fueron homogeneizadas en medios específicos que contenían inhibidores de proteasas. Una pequeña alícuota fue conservada, y el resto del homogeneizado fue centrifugado a $350 \times g$ durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a $80000 \times g$ durante 45 minutos para separar la fracción citosólica de la fracción membranosa cruda. Las membranas plasmáticas fueron extraídas de esta última fracción mediante partición de doble fase (6-6,4% de dextrano y polietilenglicol).

Para el análisis de ácidos grasos de la membrana plasmática, se extrajeron los lípidos mediante el método de Bligh-Dyer. Ésteres metílicos de ácidos grasos fueron extraídos con éter de petróleo y agua, y separados y cuantificados mediante análisis por cromatografía de gases en columna capilar.

Las actividades proteolíticas de las caspasas -8, -9 y -3 fueron determinadas mediante un ensayo fluorimétrico, en presencia y en ausencia de inhibidores específicos. La señal de fluorescencia fue detectada a las longitudes de onda de 380 nm (excitación) y 460 nm (emisión). La fragmentación del ADN (índice apoptótico) fue cuantificada utilizando el kit de ELISA desarrollado por Roche Diagnostics, basado en la detección de mono- y oligonucleosomas derivados de la fragmentación de la cromatina.

Para la inmunodetección de proteínas relacionadas con la muerte celular, una cantidad aproximada de 50 μg de proteína fue sometida a separación mediante SDS-PAGE, y a continuación transferida a membranas de nitrocelulosa. Dichas membranas fueron teñidas con Ponceau S para visualizar y cuantificar las proteínas transferidas. Los polipéptidos Bax, Bcl-2 y XIAP fueron determinados en muestras de homogeneizado total, mientras que AIF, Hsp70 y citocromo *c* fueron medidos en fracciones citosólicas. La unión de los anticuerpos específicos fue revelada mediante quimioluminiscencia asociada a actividad peroxidasa.

Los niveles de coenzima Q fueron determinados en fracciones enriquecidas en membrana plasmática. Las isoformas de coenzima Q (CoQ₉ and CoQ₁₀) fueron extraídas en hexano y, a continuación, este extracto lipídico fue disuelto en metanol y usado para su cuantificación mediante HPLC de fase reversa. También en fracciones enriquecidas en membrana plasmática se determinó la

actividad esfingomielinasa neutra. Se empleó como sustrato una mezcla de esfingomielina y [metil-¹⁴C]-esfingomielina, y tras el ensayo se cuantificó la [¹⁴C]-fosforilcolina mediante un contador de centelleo.

Resultados y discusión

En línea con lo esperado, el músculo esquelético y el hígado muestran respuestas diferentes a las intervenciones dietéticas, probablemente debido a sus particulares características y metabolismo.

Con respecto a la composición lipídica, tanto el sarcolema como la membrana plasmática de hígado muestran un perfil de ácidos grasos altamente saturado y con un contenido estable en ácidos grasos monoinsaturados, mientras que el contenido en PUFA de las series n-6 y n-3 es dependiente de la grasa de la dieta. La proporción de ácido araquidónico y de los principales ácidos grasos n-3 (EPA, DHA) en las membranas se asocia, de forma diferente en cada caso, con la ratio n-6/n-3 de la grasa de la dieta. El contenido total de PUFA en ambos órganos disminuye con la edad. Los ácidos grasos n-3 se encuentran prácticamente ausentes en los animales viejos de la dieta *CR-Lard*, con ligeras diferencias entre los tejidos estudiados.

En el músculo esquelético no se observan diferencias en el índice apoptótico, medido como fragmentación del ADN, debido al envejecimiento, a la restricción calórica o al tipo de componente grasa. Estudios anteriores han detectado un incremento del índice apoptótico en ratones de 25 meses de edad y, teniendo que nuestros animales tenían una edad de 21 meses (18 meses de intervención dietética) al llevarse a cabo nuestras determinaciones, podríamos estar ante un indicio de un desarrollo tardío de la sarcopenia del envejecimiento en ratones o, al menos, de una implicación más tardía de los procesos apoptóticos en dicha enfermedad.

Un análisis detallado de la cascada de señalización apoptótica en el músculo esquelético muestra discordancias entre los niveles de fragmentación del ADN y la actividad de las caspasas -8, -9 y 3. El envejecimiento no afecta a la actividad de las caspasas en la dieta *CR-Lard*, pero provoca incrementos de algunas actividades en el grupo *CR-Soy* y, sobre todo en los ratones sometidos a la dieta *CR-Fish*, con respecto a los ratones jóvenes. Los niveles citosólicos de AIF, una proteína responsable de la apoptosis independiente de caspasas, son el único parámetro cuya evolución coincide con los niveles de fragmentación del ADN, dada la ausencia de cambios. Algunos estudios previos en ratas han sugerido un papel prominente de la apoptosis independiente de caspasas en el músculo esquelético de animales viejos .

De acuerdo con nuestros resultados, los cambios en la ratio Bcl-2/Bax, que tiende a disminuir en un ambiente celular proapoptótico, muestran más dependencia de la grasa de la dieta que del envejecimiento o la restricción calórica. Los valores de dicha ratio en los animales del grupo *CR-Fish* son mayores en los de la dieta *CR-Lard*. Estas variaciones basadas en la dieta afectan principalmente a los niveles de Bax, mientras que Bcl-2 permanece inalterada entre las diferentes dietas, pese a mostrar un incremento con la edad en todos los grupos.

En los ratones jóvenes, la restricción calórica y la grasa de la dieta tienen efectos claros y consistentes sobre la señalización apoptótica, ya que los ratones alimentados con una dieta de restricción calórica con aceite de soja muestran menores niveles de proteína Bax, menores niveles citosólicos de citocromo *c* y de AIF y menor actividad esfingomielinasa neutra, que en la dieta AL-Soy. Entre las diferentes dietas de restricción calórica, observamos menores niveles de las caspasas -8 y -9 en el músculo esquelético del grupo CR-Fish, junto con una mayor cantidad de coenzima Q en la membrana plasmática y un descenso en la actividad esfingomielinasa, así como menores niveles de Bax, en comparación con el resto de las dietas CR.

En consecuencia, consideramos que seis meses de restricción calórica generan lo que se ha dado en llamar un “ambiente” celular antiapoptótico, el cual es potenciado por la inclusión de aceite de pescado en la dieta, incluso aunque estas alteraciones en las cascadas de señalización no tengan un efecto sobre los niveles de actividad caspasa-3 o sobre la fragmentación del ADN. Sin embargo, en un estudio estructural realizado de forma paralela por nuestro grupo, se observan cambios en el área de las secciones transversales de fibras musculares y en su circularidad. Un descenso en el área de la sección transversal de las fibras y un incremento de la circularidad de dicha sección pueden indicar una pérdida parcial de integridad en el tejido muscular. Hemos detectado cambios significativos en ambos parámetros mediante microscopía electrónica, cuyo patrón coincide con las tendencias anteriormente mencionadas indicando, por tanto, un efecto sutil de la restricción calórica y de la grasa de la dieta sobre la muerte celular por apoptosis en ratones jóvenes.

El mencionado “ambiente” antiapoptótico no es observado, por el contrario, en animales viejos. En ratones sometidos a 18 meses de tratamiento se invierten las tendencias de las caspasas entre las distintas dietas y el resto de los cambios a los que se ha hecho referencia resultan atenuados, como ocurre en el caso de los niveles de coenzima Q₁₀ del sarcolema, o desaparecen, como los cambios en los niveles citosólicos de AIF y citocromo *c*.

En el hígado, el índice apoptótico muestra alteraciones significativas con la edad y las intervenciones dietéticas. Se detecta un aumento de la apoptosis con el envejecimiento en todos los grupos de estudio con la única excepción de la dieta CR-Lard. Se observa, además, una tendencia significativa según la cual los grupos con una mayor proporción n-3/n-6 en los ácidos grasos de la dieta presentan mayores niveles de índice apoptótico, tanto a los 6 como a los 18 meses de intervención dietética. Entre el resto de los parámetros estudiados, ninguno muestra un patrón totalmente coincidente con la fragmentación del ADN. Por lo tanto, no podemos extraer una explicación mecanística directa a partir de los datos disponibles.

De acuerdo con nuestros resultados, la restricción calórica no afecta a la ratio Bcl-2/Bax. No se observan cambios entre las dietas con diferentes fuentes de grasa, ni en animales jóvenes ni en animales viejos. Sin embargo, el envejecimiento tiende a disminuir la proporción Bcl-2/Bax en todas las dietas. En los grupos AL-Soy y CR-Soy, ese descenso se debe a los menores niveles de Bcl-2, mientras

que en los grupos *CR-Lard* y *CR-Fish* se produce como consecuencia del incremento en los niveles de Bax.

Los niveles citosólicos de citocromo *c* se incrementan considerablemente en el hígado de los animales de 21 meses de todas las dietas. Los animales viejos del grupo *CR-Lard* muestran niveles 10 veces superiores a los de los jóvenes, y significativamente superiores a los que recibieron una dieta *CR-Fish* durante 18 meses. Sin embargo, AIF no comparte estas tendencias, y los niveles citosólicos de esta proteína descienden en los animales viejos de la dieta *CR-Soy*. Un descenso estadísticamente no significativo se produce en el grupo *CR-Fish*, de manera que entre los animales viejos es la dieta *CR-Lard* la que genera mayores niveles de AIF citosólico. Como consecuencia, no se puede establecer una relación directa entre el índice apoptótico y la señalización de muerte celular independiente de caspasas.

Los niveles de XIAP sufren un importante aumento en los animales viejos de la dieta *AL-Soy*, y la restricción calórica reduce la magnitud de dicho incremento. La actividad de las caspasas varía dependiente de la edad y de la intervención dietética. La restricción calórica inhibe la actividad de las caspasas -3, -8 y -9 en animales jóvenes, pero no en el grupo de 18 meses de tratamiento. Además, el envejecimiento tiende a incrementar la actividad de las caspasas iniciadoras (-8 y -9) en los grupos sometidos a restricción calórica. En conjunto, nuestros datos sugieren un incremento generalizado de la señalización apoptótica con la edad. Centrándonos en los grupos CR, la actividad caspasa-8 se eleva en los animales viejos. Se ha descrito cómo, en hepatocitos, la ruta extrínseca precisa de amplificación de su señal a través de la maquinaria apoptótica mitocondrial, lo cual coincide con el descenso que observamos en la ratio Bcl-2/Bax. El incremento en los niveles citosólicos de citocromo *c* y en la actividad de la caspasa-9 son consecuencias lógicas de este desequilibrio, y la elevación de XIAP podría ser responsable de los niveles inalterados o disminuidos de la caspasa-3 en los animales viejos.

En estas condiciones, no es posible por el momento la identificación de la enzima responsable de la degradación del ADN observada. En algunos modelos, la fragmentación del ADN es un evento tardío en la apoptosis, y tiene lugar parcialmente después de la fagocitosis. Además, existen numerosas proteínas reguladoras y efectoras de la apoptosis que no han sido incluidas en nuestro estudio.

Está por determinar el significado fisiológico de la interesante ausencia de incremento de la apoptosis con el envejecimiento en la dieta *CR-Lard*. El aumento de la muerte celular contribuye a la eliminación de hepatocitos potencialmente tumorigénicos. Sin embargo, recientes investigaciones han mostrado un aumento en la incidencia de tumores hepáticos en ratones KO para genes antiapoptóticos, y un descenso en ratones que no expresan ciertos genes proapoptóticos de la familia Bcl-2. En consecuencia, el papel de la muerte celular en el desarrollo de hepatocarcinogénesis se encuentra actualmente en revisión. Por otro lado, los animales del grupo *CR-Lard* mostraron la mayor longevidad media y máxima de entre todos los grupos, según un estudio paralelo de longevidad que usó las mismas intervenciones dietéticas (Ramsey J.J., datos no publicados). Se están realizando análisis complementarios para estudiar la incidencia del cáncer en animales sometidos a estas dietas.

PREFACIO

La investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral forma parte de un programa de colaboración entre grupos de la Universidad de Córdoba, la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla) y la Universidad de California en Davis, en el marco de un proyecto común financiado por los *National Institutes of Health* (NIH, Estados Unidos). El objetivo global de dicho proyecto es determinar la medida en que la restricción calórica causa una alteración en la composición de las membranas mitocondrial y plasmática, de la que se derive un nuevo balance bioenergético que disminuya tanto la producción de especies reactivas de oxígeno como el daño oxidativo a las membranas. Para ello, se ha estudiado la composición de las membranas celulares, así como un conjunto de procesos celulares vinculados a ellas.

Este marco colaborativo ha permitido analizar los resultados de nuestro trabajo de una forma más completa, al disponer de información adicional sobre una variedad de parámetros fisiológicos estudiados por los grupos participantes en el proyecto internacional.

INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento

El envejecimiento de un organismo ha sido definido como la pérdida progresiva de función en los distintos tejidos que lo componen, debido a la degradación de sus componentes a nivel molecular, llevando aparejada una menor fertilidad, mayor vulnerabilidad y susceptibilidad a un gran número de enfermedades de diversa naturaleza, tales como procesos degenerativos de carácter nervioso o muscular, alteraciones del sistema inmune o tumores derivados de la desregulación de la proliferación celular, y mayor mortalidad [1].

La naturaleza del envejecimiento, según se acepta de forma generalizada, consiste en una degradación progresiva de los sistemas biológicos como consecuencia de daños producidos de forma aleatoria y acumulativa a lo largo del tiempo. La idea de una programación genética del envejecimiento ha sido desechada a medida que quedaba demostrado que en ningún organismo modelo, ni siquiera en los que se han producido modificaciones dirigidas hacia una amplia variedad de genes, se ha conseguido abolir experimentalmente este proceso [1-2]. Por el contrario, se acepta que la selección natural ha propiciado que la producción, mantenimiento y reparación de los tejidos y sistemas se lleve a cabo de una forma lo suficientemente adecuada hasta que el individuo alcanza la madurez sexual. A partir de este momento, la degradación endógena que irá afectando de manera estocástica a sus componentes determinará la velocidad a la que el organismo perderá funcionalidad y, en última instancia, capacidad de supervivencia. Es necesario señalar, además, que los procesos de envejecimiento tienen una importancia relativa en la naturaleza, ya que las causas extrínsecas de mortalidad (enfermedades, accidentes, depredación, etc.) son tan frecuentes que sólo un reducido número de individuos sobrevive hasta estadios de su vida próximos a la longevidad máxima de la especie [1].

Numerosas teorías han tratado de explicar el proceso de envejecimiento a lo largo de la historia. El grado en el cual las teorías modernas consiguen explicar los mecanismos del envejecimiento a nivel molecular es objeto de controversia, y algunos estudios recientes sugieren que varias de ellas pueden hallarse interconectadas [3]. La teoría del acortamiento de los telómeros, por ejemplo, sugiere que el número de divisiones que una célula es capaz de soportar es limitado, y que dicha limitación obedece al progresivo acortamiento de los telómeros, secuencias repetitivas encargadas de proteger físicamente los extremos de los cromosomas. Un número limitado de divisiones protegería al organismo frente a la aparición de células cancerosas, mientras que el envejecimiento vendría provocado por la imposibilidad de reemplazar a las células sanas a un ritmo suficiente, siendo un daño colateral de la protección frente al cáncer [4].

Otras muchas teorías, no excluyentes entre sí, han sido propuestas y recogidas en varias revisiones [5]. De ellas, la teoría del envejecimiento por radicales libres es, sin lugar a dudas, la más aceptada. Postula que la producción de especies reactivas de oxígeno, especialmente en la mitocondria es capaz de dañar progresivamente toda clase de biomoléculas presentes en la célula, condicionando así su funcionalidad [6-7].

Relacionada con ella, encontramos otra teoría que otorga gran importancia a los lípidos presentes en la célula, como posibles reguladores del daño oxidativo que ésta recibe, y se conoce como *membrane theory of aging*, o “teoría de las membranas del envejecimiento” [8-9]. A continuación se detallan los principales argumentos de estas teorías.

1.1 Teoría del envejecimiento por radicales libres

En 1956, Denham Harman propuso esta teoría, que en la actualidad proporciona la base para la comprensión del proceso de envejecimiento, según la mayor parte de los investigadores. Según sus postulados originales y diversas aportaciones que fue recibiendo a lo largo de varios años, las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) producidas en la mitocondria y otros orgánulos son responsables de un ataque sostenido sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en la célula. La incapacidad de los mecanismos antioxidantes celulares para contrarrestar este daño supone la pérdida progresiva de funcionalidad [6].

La producción endógena de ROS tiene lugar, principalmente, en la membrana interna mitocondrial, durante el proceso de fosforilación oxidativa para producir moléculas de adenosín trifosfato (ATP). Los complejos enzimáticos NADH-Q oxidoreductasa (complejo I) y coenzima Q-citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III), pertenecientes a la cadena de transporte de electrones, son las principales fuentes de ROS, generando anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) en una proporción del 1-2% del total de moléculas de oxígeno reducidas. Los peroxisomas son asimismo una fuente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y otros muchos procesos metabólicos producen de forma colateral especies reactivas, sean o no radicales libres [10-12].

La célula dispone de sistemas antioxidantes enzimáticos, como la superóxido dismutasa, capaz de reducir el anión superóxido a peróxido de hidrógeno, y la catalasa, que detoxifica esta última molécula, así como no enzimáticos, consistentes en moléculas como el glutatión reducido (que precisa de actividades enzimáticas asociadas), el α -tocoferol, la ubiquinona o coenzima Q, el ácido ascórbico y compuestos fenólicos, entre otros. Diversas proteínas antioxidantes forman también parte de este sistema protector. El desequilibrio

entre producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno da como resultado un estado de estrés oxidativo. La peroxidación lipídica, especialmente importante en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, más susceptibles a estos agentes, es una consecuencia de dicho estrés oxidativo. Aminoácidos como la cisteína son también dianas de las ROS en las proteínas. Algunas de estas reacciones generan nuevos compuestos, como el hidroxinonenal producido en la peroxidación lipídica, que pueden extender el daño mediante una reacción en cadena [10].

Se ha sugerido, por otra parte, un papel de las ROS como mensajeros intracelulares, otorgándoles una importancia activa en el metabolismo celular más allá de la acción deletérea derivada del ataque a biomoléculas [13]. La proliferación celular y la progresión en el ciclo celular estarían moduladas por las concentraciones de ROS. Valores demasiado altos de estas moléculas provocarían la detención del ciclo celular e incluso la muerte de la célula [14]. La actividad de algunas especies reactivas de oxígeno como oxidantes suaves en condiciones fisiológicas podría modular el estado redox de la célula y controlar así los mencionados procesos, sin que se produzcan interacciones dañinas irreparables.

1.2 Teoría del envejecimiento en función de la composición lipídica de las membranas celulares

En estrecha relación con la teoría de los radicales libres, pero más reciente y menos difundida, encontramos la hipótesis de que las características de los lípidos integrados en las membranas celulares condicionan la intensidad del daño oxidativo que reciben, afectando en consecuencia al envejecimiento y la longevidad [8]. De hecho, las biomoléculas más susceptibles al daño por ROS son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), concretamente aquellos átomos de carbono situados entre dos dobles enlaces.

Algunos estudios comparativos han mostrado interesantes correlaciones entre la longevidad máxima (L_{max}) de las especies y las características de sus lípidos de membrana, y han observado que los únicos dos parámetros que correlacionan de manera significativa con la longevidad máxima son la producción de especies reactivas de oxígeno (inversamente) y el grado de saturación de los lípidos de membrana (en relación directa) [8]. Así, en una comparación entre ocho especies de mamíferos, el parámetro conocido como índice de dobles enlaces (DBI) es mayor en los animales con una menor longevidad máxima. Cuando se comparan distintas clases de vertebrados, aves y mamíferos del mismo tamaño corporal, las aves muestra una mayor longevidad y un menor DBI [15]. La correlación inversa entre DBI y

L_{max} , según fueron probando diversos estudios, es válida en los fosfolípidos mitocondriales y totales de corazón e hígado [16-18].

Diseños experimentales con intervenciones dietéticas, incluyendo como componente lipídico mayoritario ácidos grasos poliinsaturados o ácidos grasos saturados (SFA), consiguieron demostrar que una bajada del DBI inducida por la manipulación de la dieta provocaba, a su vez, un descenso de la peroxidación lipídica y del nivel de grupos carbonilo en proteínas, entre otros indicadores de daño oxidativo [19].

Se ha sugerido que existe un patrón de expresión de enzimas desaturasas propio de cada especie, así como una regulación estrecha del ciclo de desacilación/reacilación, como mecanismos de homeostasis en lo que se refiere al grado de saturación de los lípidos de membrana [17].

2. Restricción calórica

De acuerdo con observaciones científicas a lo largo de la historia, que condujeron a las primeras teorías al respecto durante la primera mitad del siglo XX (revisado en [20]), una ingestión de alimentos reducida respecto a los estándares habituales se consideraba beneficiosa para la salud y para la longevidad. Una bajada del 40% en la ingesta calórica aumentaba de forma notable la longevidad máxima en poblaciones de rata, resultado que en los últimos veinte años se ha podido reproducir en una gran variedad de organismos modelo, desde levaduras, nematodos o moscas hasta otros mamíferos [21-24].

La restricción calórica sin malnutrición, es decir, preservando en todo momento el equilibrio de los nutrientes proporcionados, es la intervención dietética más estudiada con un efecto positivo sobre la longevidad máxima, habiendo aparecido otras estrategias similares que también ofrecen resultados equivalentes (como la restricción de metionina [25]). El incremento de la longevidad máxima es proporcional a la duración del tratamiento y a la intensidad del mismo, existiendo unos límites establecidos en una reducción de la ingesta calórica de 55-60%, nivel a partir del cual los efectos dejan de ser positivos y empiezan a provocar un empeoramiento de los parámetros de longevidad (**figura 1**). Sin embargo, estos límites entre los efectos beneficiosos y perjudiciales no han sido estudiados en profundidad [26-29]. En un intento por comprender los beneficios que la restricción calórica o los mecanismos relacionados con ella pueden ofrecer a los seres humanos, se están llevando a cabo ensayos en poblaciones de macacos Rhesus, que están ofreciendo resultados

satisfactorios en la prevención de enfermedades vinculadas al envejecimiento, aunque contradictorios en lo que se refiere a la extensión de la longevidad [30-31].

La aplicación de la restricción calórica causa cambios sustanciales en numerosos procesos metabólicos, apreciándose una tendencia a retrasar los efectos del envejecimiento en el 80-90% de las variaciones detectadas en procesos tales como la reparación del ADN, la regulación del metabolismo de la glucosa, la respuesta inmune, la actividad de las hormonas, las capacidades cognitivas, la hipertrofia muscular o la tasa de síntesis proteica [26, 32]. Como consecuencia, diversas enfermedades vinculadas al envejecimiento como la sarcopenia, problemas cardiovasculares, obesidad, diabetes o cáncer se ven retardadas por la restricción calórica [33]. La pérdida de neuronas en modelos de Parkinson o Alzheimer se ve atenuada [34-35], así como el deterioro de las capacidades psicomotoras [36].

La restricción calórica retrasa o disminuye la posibilidad de aparición de diferentes tipos de cáncer, incluyendo melanomas, hepatomas, tumores mamarios, linfomas [24, 37-41]. En términos generales, el tratamiento podría estar provocando en diversos tejidos un cambio en el equilibrio entre proliferación y apoptosis, de manera que se potencie la muerte celular programada y, por tanto, la protección frente a la posible aparición de células transformadas.

El mecanismo mediante el cual la restricción calórica disminuye la tasa de tumores podría basarse en una menor frecuencia de mutaciones en el ADN. La gran cantidad de daño en el ADN así como la abundancia de tumores en ratones *knockout* para la enzima superóxido dismutasa [42], en combinación con el patrón de mutaciones en el gen *Hprt* (de la enzima hipoxantina fosforribosiltransferasa), indica que la disminución en el estrés oxidativo, provocado por las ROS, en condiciones de restricción calórica podría ser la causa de la prevención del cáncer en estos animales [43-44].

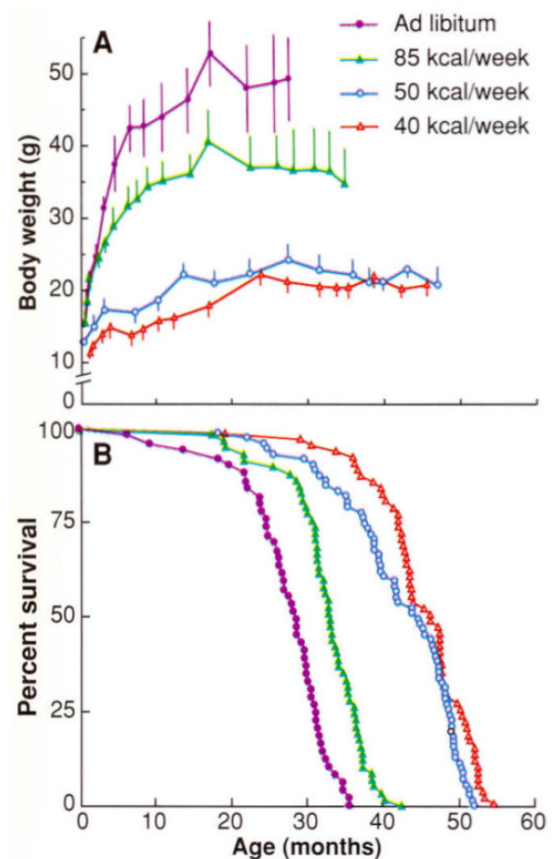


Figura 1. Efecto de la restricción calórica sobre el peso y la longevidad en ratones. La dieta de 85 kcal/semana supone un 25% de restricción, 55% en el caso de 50 kcal/sem y 65% para 40 kcal/sem (tomado de [50]).

Se ha sugerido también que la drástica disminución en la cantidad de tejido adiposo blanco en el cuerpo como consecuencia de la baja ingesta calórica podría estar contribuyendo a la disminución en el riesgo de desarrollar tumores a través de la regulación de los niveles de leptina [45-46] y adiponectina circulantes [47] (en este último caso, a través de un incremento en la apoptosis).

2.1 Restricción calórica y producción de especies reactivas de oxígeno

El efecto sobre la producción de ROS es uno de los aspectos mejor estudiados de la restricción calórica. Según resume John R. Speakman en su reciente revisión [20], la RC incide sobre las tres posibles dianas en la protección frente a ROS: su generación, su detoxificación y la corrección del daño producido.

La RC reduce la producción de especies reactivas de oxígeno [48-51], disminuyendo la producción de radical superóxido en el complejo I de la cadena de transporte de electrones [52-54]. En lo referente a la protección antioxidante, la RC evita el descenso provocado por el envejecimiento en los niveles hepáticos de glutatión reducido y de las actividades superóxido dismutasa y catalasa [55], aunque parece ser un efecto dependiente del tejido. También se incrementa la estabilidad del genoma, al impedirse el descenso de la actividad de reparación por escisión de base (BER) que se observa en los animales más viejos [56].

La relación directa entre la disminución en el estrés oxidativo y el retraso en la aparición de enfermedades vinculadas al envejecimiento (y, por extensión, el incremento de la longevidad media y máxima) es una pregunta aún abierta, en una medida similar a las cuestiones que permanecen sin esclarecer sobre la propia teoría del envejecimiento por radicales libres [57].

2.2 Restricción calórica y grado de insaturación de los ácidos grasos en las membranas celulares

Ya se ha descrito cómo existe, a nivel de comparación entre especies, una relación inversa entre la cantidad de dobles enlaces en los ácidos grasos de las membranas y la longevidad máxima. La restricción calórica disminuye el grado de insaturación en las membranas celulares, favoreciendo la acumulación de los ácidos grasos linoleico (18:2 n-6) y linolénico (18:3 n-3) en detrimento de ácidos grasos de cadena más larga y con un mayor número de insaturaciones [58-59]. De este modo, las membranas de los animales sometidos a la restricción calórica se encuentran más protegidas frente a la acción de las especies

reactivas de oxígeno, constituyendo un factor más que colabora a la disminución de su efecto sobre la célula.

El mecanismo de acción mediante el cual se produce este cambio no está totalmente elucidado, pero se asocia con el descenso en los niveles de algunas hormonas circulantes, especialmente la insulina y las hormonas tiroideas T_3 y T_4 , que ejercen regulación sobre las actividades elongasas y desaturasas de ácidos grasos (revisado en [27]).

3. Ácidos grasos y sus funciones biológicas

3.1 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas compuestas por un grupo carboxilo y una cadena hidrocarbonada lineal con un elevado número de átomos de carbono (siempre par, entre 14 y 22 los más habituales). Raramente presentes de forma aislada en la naturaleza, suelen formar parte de moléculas lipídicas más complejas, y como tales son componentes fundamentales en las membranas biológicas.

Su nomenclatura se realiza de acuerdo con las normas de la IUPAC, pero su importancia en los procesos biológicos ha provocado que existan, por un lado, nombres tradicionales que se siguen usando para los ácidos grasos más comunes o con un papel fisiológico más destacado y, por otro, sistemas de nomenclatura alternativos y propios de este tipo de moléculas. Así, aunque el carbono 1 de la molécula es aquél que pertenece al grupo carboxilo (a veces se emplea la letra griega Δ para numerar los carbonos desde el grupo carboxilo), una alternativa consiste en comenzar a contar desde el carbono del grupo metilo terminal de la cadena, considerado el carbono ω , de manera que el tercer carbono desde ese extremo será el $\omega-3$ o, en ocasiones, n-3. Esta es la nomenclatura de consenso habitualmente empleada en la literatura biomédica.

En función de la presencia de dobles enlaces entre los carbonos de la cadena, y de su número y localización, se pueden clasificar los ácidos grasos de la siguiente manera:

- Ácidos grasos saturados (SFA, de *saturated fatty acid*). Son aquellos en los que no existe ningún doble enlace a lo largo de la cadena hidrocarbonada. Presentan un punto de fusión relativamente alto (ácido esteárico, 70°C), tanto más cuanto más larga sea la cadena. Se pueden identificar mediante la fórmula abreviada n:0, donde n es el número de carbonos presentes en la cadena (ácido esteárico, 18:0).

- Ácidos grasos insaturados. Son aquellos en los que existe al menos un doble enlace entre dos carbonos de la cadena. Según el número de dobles enlaces se distingue entre ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA). La mayor parte de los ácidos grasos insaturados poseen un doble enlace entre sus carbonos 9 y 10 y, en el caso de que haya más de uno, se disponen entre éste y el grupo metilo terminal, dejando siempre un grupo metilo ($-CH_2-$) entre dos dobles enlaces. Este tipo de disposición permite identificar perfectamente a cada ácido graso de una manera simplificada, indicando la longitud de la cadena, el número de dobles enlaces y el carbono en el que dichos dobles enlaces comienzan. Por ejemplo, la fórmula abreviada 20:5 ω -3 (o n-3) identifica al ácido eicosapentaenoico (EPA), con cinco dobles enlaces, el primero de los cuales se encuentra entre los carbonos ω -3 y ω -4

3.2 Acilgliceroles

Los acilgliceroles son un tipo de lípidos complejos que contienen ácidos grasos esterificados con una molécula de glicerol. Pueden contener uno, dos o tres ácidos grasos, y dependiendo de ello reciben el nombre de mono, di o triacilgliceroles, también llamados triglicéridos en el lenguaje médico tradicional. Dependiendo de si dichos ácidos grasos son iguales entre sí o no, se distinguen, respectivamente, acilgliceroles homogéneos o simples y heterogéneos o mixtos.

Los triacilgliceroles son los principales componentes de las grasas alimentarias, y las propiedades físicas de las mismas dependen de la naturaleza de los ácidos grasos que contengan. Triacilgliceroles ricos (más de un 50%) en ácidos grasos saturados, como los que componen la manteca de cerdo, son sólidos a temperatura ambiente. Las grasas con gran cantidad de ácidos grasos insaturados (a menudo, más del 80%) son líquidas y constituyen los llamados aceites.

La distinta proporción entre monoinsaturados y poliinsaturados, así como entre los distintos tipos de PUFA, definirán las propiedades físicas, químicas y dietéticas de cada tipo de aceite.

3.3 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son lípidos complejos que, como los acilglicéridos, poseen una molécula de glicerol esterificada con ácidos grasos, pero uno de los carbonos terminales del glicerol está unido a un grupo fosfato y éste, a su vez, a un aminoalcohol. La longitud más

frecuente de los ácidos grasos que componen los fosfolípidos es de 16 y 18 átomos de carbono, y los ácidos grasos poliinsaturados son abundantes en este tipo de lípido. En cuanto al aminoalcohol, se distinguen varios tipos de fosfolípidos atendiendo al grupo que se enlace al fosfato: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol.

Las esfingomielinas, que son estrictamente esfingolípidos, se mencionan también como fosfolípidos por la semejanza de sus propiedades físicas y por tener un grupo fosfato unido a un alcohol. Su base es una molécula de esfingosina, a la que se une mediante un enlace amida un único ácido graso. La fosforilcolina se une mediante un enlace éster.

La función principal de los fosfolípidos es estructural, formando parte integrante y fundamental de las membranas celulares. Los fosfolípidos poseen la propiedad de ser moléculas antipáticas: tienen una parte polar y otra apolar. La parte polar es la llamada cabeza hidrofílica de la molécula, donde se encuentra el aminoalcohol, cuyo átomo de nitrógeno está cargado positivamente. La parte apolar o hidrofóbica es la cola hidrocarbonada de los ácidos grasos. De este modo, los ácidos grasos quedan embebidos en la parte interior de una bicapa lipídica que sólo muestra al exterior las zonas polares de las moléculas.

3.4 Membrana plasmática: estructura y funciones

La membrana plasmática es la estructura que define a la célula y separa su citoplasma del medio externo. Está formada por lípidos y proteínas, aunque se encuentran residuos de azúcares asociados a ella. Su base es la existencia de una bicapa de fosfolípidos, en la que, como se ha explicado, las zonas apolares de las moléculas se disponen en el interior de la misma, mientras que las partes polares o hidrofílicas se muestran tanto hacia el citoplasma como hacia el exterior.

La membrana plasmática se caracteriza por su gran asimetría. Mientras que hacia el lado exterior se exponen las unidades de fosfatidilcolina y esfingomielina, hacia el interior se encuentra la fosfatidilserina, la fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol, poco abundante este último, pero de gran importancia en los procesos de señalización. Asimismo, se exponen hacia la cara externa los glicolípidos, que suponen un 2% de los lípidos de la membrana plasmática. El colesterol es altamente abundante, y contribuye a regular la fluidez de la bicapa intercalándose entre las cadenas de los ácidos grasos.

Además, una gran cantidad de proteínas se encuentran integradas o asociadas a la membrana plasmática, ejerciendo funciones de transporte de moléculas, de transducción de señales o de interacción entre células o entre la célula y la matriz extracelular. Este modelo

en el cual las proteínas y los lípidos se reparten casi al 50% la composición de la membrana (en peso, ya que en número de moléculas la proporción es de 1 a 50 ó 100), y en el que las primeras se mueven lateralmente con cierta libertad en la bicapa lipídica, se denomina modelo del mosaico fluido, y fue propuesto en 1972 [60].

Las proteínas pueden ser periféricas, presentando una unión laxa a la membrana, reversible por cambios en el pH o en la salinidad, o bien integrales. Las proteínas integrales de membrana, por el contrario, se encuentran unidas covalentemente a algún lípido o bien tienen dominios que se integran en la bicapa lipídica gracias a las propiedades hidrofóbicas de algunos de sus aminoácidos (proteínas transmembrana). En el caso de las proteínas transmembrana, que presentan partes expuestas tanto al interior como al exterior de la célula, las regiones hidrofóbicas consisten en grupos de 20 o 25 aminoácidos dispuestos en forma de hélice α . Estas proteínas transmembrana son fundamentales en la transducción de señales extracelulares y en la formación de canales de transporte de iones o moléculas más pesadas.

3.5 Incorporación de ácidos grasos de la dieta

Los ácidos grasos ingeridos deben encontrarse en forma libre o como monoacilglicerol para poder ser absorbidos a través de la membrana de las células del epitelio intestinal. Tras la ingestión en la dieta de triacilglicerol (ver más adelante), es necesario que las sales biliares como el colato formen micelas que incorporen estos lípidos, orientando los enlaces éster hacia la superficie de la micela para que puedan ser atacados por las lipasas pancreáticas. Las lipasas liberan dos unidades de ácidos grasos y un monoacilglicerol, que servirán para resintetizar los triglicéridos en las células de la mucosa intestinal e incorporarlos a los quilomicrones, partículas lipoproteicas de hasta 0,5 μm de diámetro.

Los quilomicrones pasan a la linfa y, a continuación a la sangre, donde sirven de sistema de transporte de lípidos, incluyendo colesterol y vitaminas liposolubles. Algunos tejidos disponen de enzimas lipoproteína lipasas capaces de volver a degradar los triacilglicerol para su incorporación a las células de destino.

3.6 Biosíntesis de los ácidos grasos

Parte de los ácidos grasos de la dieta pueden ser incorporados a los fosfolípidos de membrana, pero la célula es capaz de sintetizar una amplia variedad de ellos, salvo los llamados ácidos grasos esenciales.

Los ácidos grasos saturados pueden ser sintetizados en el citosol por la enzima ácido graso sintasa o sintetasa, una única cadena polipeptídica de 260 kDa con siete centros funcionales diferentes, que dimeriza para realizar su función. La síntesis comienza a partir del grupo acetilo del acetil-CoA, que es transferido a un grupo sulfhidrilo del centro activo de la enzima condensante (CE, en realidad, un dominio de uno de los monómeros). Por su parte, el grupo malonilo del malonil-CoA es cedido a otro grupo sulfhidrilo del otro monómero de la enzima, en un dominio que hace la función de proteína portadora de acilos (ACP), según la analogía existente con el proceso en procariotas. La primera reacción de elongación se produce por la unión del acetilo de la CE a un fragmento de dos carbonos del malonilo unido a la ACP, con liberación de CO₂. Como consecuencia, se obtiene una unidad de acetoacetil-S-fosfopanteteína sobre el dominio ACP.

El acetacetilo se transloca a otro centro activo quedando reducido a butirilo y formándose así la primera cadena saturada de cuatro átomos de carbono, que es devuelta al centro activo de la enzima condensante para volver a comenzar el ciclo. Cinco repeticiones después, se obtiene una cadena de palmitilo, que es hidrolizada para formar palmitato libre, el producto final de la síntesis.

El ácido palmítico es el precursor del resto de ácidos grasos con mayor longitud de cadena o más insaturados, con la excepción de los esenciales. Dado el carácter hidrofóbico de la molécula, tiende a abandonar con rapidez el ambiente acuoso del citosol para asociarse a las membranas celulares. Así, en el retículo endoplásmico, existen enzimas capaces de agregar más grupos acetilo, procedentes de unidades de malonil-CoA, alargando los ácidos grasos siempre con un número par de átomos de carbono. A partir del palmitato se sintetizan de esta manera el ácido esteárico y el ácido araquídico o eicosanoico (20:0), por ejemplo.

También en el retículo endoplásmico se encuentra la maquinaria enzimática necesaria para producir las insaturaciones en las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, pudiéndose generar de esta forma el ácido palmitoleico (16:1 n-7) a partir del palmítico, o el oleico (18:1 n-9) a partir del esteárico.

La introducción de dobles enlaces (insaturaciones) en las cadenas se lleva a cabo por enzimas desaturasas, nombradas según el primer carbono del doble enlace, ya sean en la nomenclatura Δ o en la ω . En los mamíferos se expresan desaturasas Δ^4 , Δ^5 , Δ^6 y Δ^9 . La

incapacidad de las enzimas disponibles a la hora de generar dobles enlaces en puntos de la cadena más distales que el carbono 9 obliga a la incorporación con la dieta de los precursores de las series n-3 y n-6, que son los ácidos grasos esenciales: el ácido linoleico (LA/18:2 n-6) y el linolénico (LNA/18:3 n-3).

3.7 Ácidos grasos esenciales: metabolismo de las series n-3 y n-6

El hecho de que existen ácidos grasos que no pueden ser sintetizados *ex novo* en las células de mamíferos fue demostrado en ratas en la primera mitad del siglo XX, mediante el uso de una dieta totalmente libre de grasa. Como consecuencia, se producían defectos de crecimiento, dermatitis, pérdida de líquido a través de la piel y problemas reproductivos (revisado en [61]). Gran parte de los avances en la comprensión de las consecuencias de la carencia de ácidos grasos esenciales en la dieta se ha producido, desafortunadamente, en base a los problemas de salud desarrollados por personas alimentadas por vía parenteral con dietas bajas en grasa [62]. En humanos, se estima que, para evitar deficiencia de las series n-3 y n-6, aproximadamente el 1-3% de las calorías ingeridas diariamente deben proceder del ácido graso LA/18:2 n-6 y un 1% del LNA/18:3 n-3. Esta última cantidad se ve reducida si lo que se incorpora con la dieta son ácidos grasos de cadena larga, como el EPA/20:5 n-3 o el docosahexaenoico (DHA), 22:6 n-3 [61].

La ruta metabólica para la generación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga comienza con la acción de una desaturasa Δ^6 sobre cualquiera de los dos ácidos grasos esenciales, seguida por una desaturasa Δ^5 y una Δ^4 , con pasos de elongación (con incorporación de dos átomos de carbono en cada uno de ellos) intercalados con los de desaturación (**figura 2**) [63].

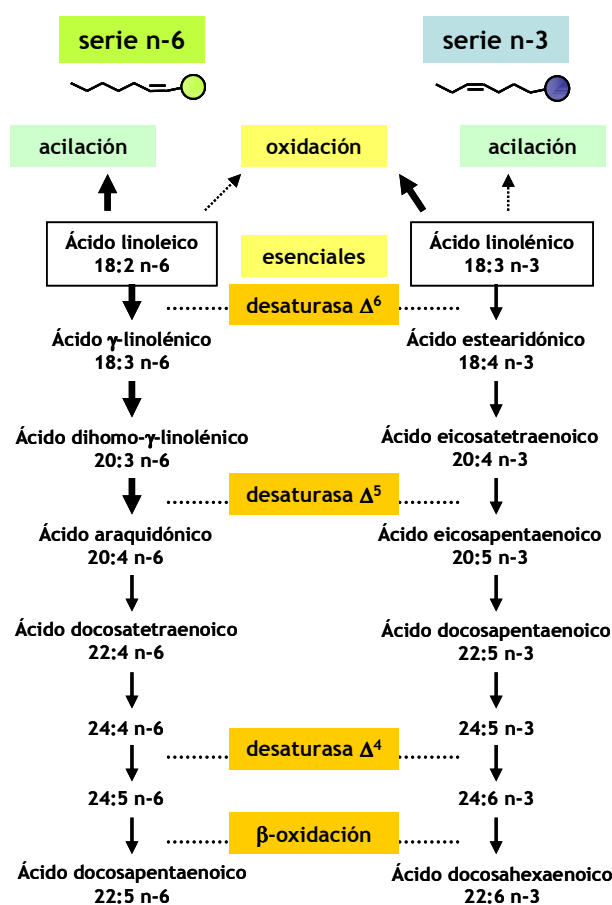


Figura 2. Síntesis de los PUFA de cadena larga a partir de sus precursores. El grosor de las flechas indica la predominancia de unas rutas metabólicas sobre sus posibles alternativas.

Como resultado se obtienen los ácidos grasos más importantes de cada una de las dos series: 20:4 (araquidónico, AA), 22:4 y 22:5 en el caso de la n-6; 20:5 (EPA), 22:5 y 22:6 (DHA) en el caso de la serie n-3. Estos ácidos grasos pueden, como se ha dicho, incorporarse con la dieta directamente o generarse a partir de los esenciales. Una ruta equivalente tiene lugar para la producción de PUFA de cadena larga a partir del ácido oleico. La elongación del LA/18:2 n-6 o del LNA/18:3 n-6 lleva la ruta a un vía sin salida, porque la actividad desaturasa Δ^8 descrita en rata presenta una actividad marginal.

El paso limitante en la generación de PUFA es la enzima desaturasa Δ^6 , pues tanto los ácidos grasos esenciales como el oleico son sus sustratos, y compiten entre sí. La afinidad de la desaturasa es mayor por el LNA (n-3) que por el LA, y mayor por éste que por el oleico [64]. De esta forma, existe una inhibición competitiva de la síntesis de PUFA a partir del ácido oleico por parte de los otros sustratos, y únicamente en situaciones de deficiencia de ácidos grasos esenciales tiene lugar su producción. Por otro lado, una dieta rica en aceite de pescado aumenta los niveles de DHA/22:6 n-3 y EPA/20:5 n-3 en los tejidos y disminuye el de AA/20:4 n-6. Se cree que estos PUFA de la serie n-3 inhiben la desaturación en Δ^6 del LA/18:2 n-6.

Se da también una relación inversa de la presencia en los tejidos de LA/18:2 n-6 y de DHA/22:6 n-3 (en dietas muy bajas en LNA y sin PUFA n-3 de cadena larga), así como un descenso en los PUFA de cadena larga de la serie n-6 cuando se incrementa en la dieta la incorporación de LNA/18:3 n-3 (para dietas con >5% de kCal procedentes de LA y muy altas proporciones de n-3) (revisado en [61]).

Incluso en dietas altas en ácidos grasos de la serie n-3, la deposición de LNA/18:3 n-3 en la mayor parte de los tejidos, con la excepción del hígado y el tejido adiposo, es reducida. La vía preferente que sigue este ácido graso es la oxidación, lo cual tiende a limitar su disponibilidad [65-66]. A pesar de que la conversión de α -linolénico en PUFA de cadena larga es poco eficiente, una vez que se inician, las sucesivas elongaciones y desaturaciones tienen lugar hasta que el ácido graso n-3 más abundante en los tejidos es normalmente el DHA/22:6 n-3 [67].

Por el contrario, en el caso de la serie n-6, el principal producto es el AA/20:4 n-6, ya que las actividades de las enzimas desaturasas Δ^6 y Δ^5 son sensiblemente mayores que la de la desaturasa Δ^4 . El paso limitante es la desaturasa Δ^6 , y los niveles de 22:5 n-6 son normalmente muy bajos [61].

El destino celular de los diferentes tipos de ácidos grasos también depende parcialmente de su perfil de dobles enlaces. Así, existe una tendencia a que los ácidos grasos

AA/20:4 n-6 y el DHA/22:6 n-3, biológicamente muy activos, se incorporen a los fosfolípidos de las membranas celulares, en lugar de integrarse en acilgliceroles y pasar a ser, principalmente, una reserva de energía [68]. Cuando se midió el modo en que las ratas utilizaban los distintos ácidos grasos para la producción de energía, se observó que el 48% del ^{14}C que se había administrado en forma de LA fue liberado en forma de CO_2 , mientras que únicamente se recuperó el 14% del AA/20:4 n-6 [69]. El EPA/20:5 n-3, sin embargo, sí resulta destinado a oxidación o a esterificación en acilgliceroles en mayor medida.

En mamíferos, la actividad desaturasa Δ^4 es muy reducida en el caso del ácido graso 22:4 n-6, que además suele sufrir acortamiento de cadena. La reacción de elongación es más común en el caso del EPA/20:5 n-3 que para el AA/20:4 n-6 [70-71]. Como resultado de estos equilibrios, tal y como se ha señalado anteriormente, AA y DHA son los PUFA de cadena larga más abundantes de las series n-6 y n-3, respectivamente, en las membranas celulares de mamíferos.

3.8 Lípidos eicosanoides y funciones biológicas de los derivados de los PUFA

Además de la influencia que tiene la presencia de PUFA en las propiedades físicas de las membranas celulares, y de su papel pasivo como diana preferente de la peroxidación lipídica, el procesamiento de algunos ácidos grasos puede generar moléculas señalizadoras cuya acción es la principal responsable de la modulación ejercida por el componente graso de la dieta sobre el desarrollo de patologías de carácter cardiovascular, inflamatorio o neurodegenerativo, entre otras.

El ácido araquidónico (AA/20:4 n-6) es el principal precursor de una serie de lípidos, conocidos colectivamente como eicosanoides, que regulan mediante señalización autocrina y paracrina procesos vinculados al sistema inmune y a la respuesta inflamatoria [72]. La enzima fosfolipasa A_2 (PLA $_2$) puede escindir ácidos grasos individuales a partir de los fosfolípidos de membrana, permitiendo que sirvan de sustrato para otras reacciones. Dos grupos de enzimas, las ciclooxigenasas (COX) y las lipooxigenasas (LOX) pueden generar varias familias de lípidos, de las cuales las mejor caracterizadas con las prostaglandinas (PG), los tromboxanos (TR, conocidos, junto con las prostaglandinas, como prostanoides) y los leucotrienos (LT). En su nomenclatura se emplean dos letras para definir a la familia, una más para establecer diferencias dentro de cada una de ellas, y un número que indica la cantidad de dobles enlaces de la molécula [73].

Algunos ácidos grasos de la serie n-3, mayoritariamente el ácido eicosapentaenoico (EPA/20:5 n-3) son también sustratos de las COX y LOX, produciendo lípidos pertenecientes a

las familias anteriores, además de las llamadas resolvinas. De manera general, mientras que los derivados del AA tienen una función proinflamatoria, los productos derivados del EPA y de otros ácidos grasos n-3 son antiinflamatorios o, en todo caso, menos proinflamatorios que los anteriores. Estas propiedades antiinflamatorias se unen a la propia capacidad de inhibición competitiva que ejercen los PUFA n-3 y el LNA sobre la producción de AA.

A partir del AA se producen, mediante la acción de las enzimas COX-1 y COX-2 y diversas sintetas, las prostaglandinas de la serie 2 (con dos dobles enlaces) y los tromboxanos A₂ y B₂ (**figura 3**). También a partir del AA, la 5-LOX inicia la producción de los leucotrienos de la serie 4. Las mismas enzimas, aunque a un ritmo menor, generan a partir del EPA las prostaglandinas de la serie 3, los tromboxanos A₃ y B₃ y los leucotrienos de la serie 5, así como la resolvina E₁. A partir del DHA, se pueden producir la resolvina D y la neuroprotectina D₁.

Ácido araquidónico (AA) 20:4 n-6	Prostaglandinas serie 2 (PGE ₂ , PGI ₂ , PGD ₂ , PGF _{2α}) Tromboxanos serie 2 (TXA ₂ , TXB ₂) Leucotrienos serie 4 (LTA ₄ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄)
Ácido eicosapentaenoico (EPA) 20:5 n-3	Prostaglandinas serie 3 (PGE ₃) Tromboxanos serie 3 (TXA ₃ , TXB ₃) Leucotrienos serie 5
Ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6 n-3	Resolvina D, neuroprotectina D ₁

Figura 3. Principales lípidos eicosanoides derivados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Los derivados del AA poseen funciones principalmente proinflamatorias, mientras que los derivados de la serie n-3 son menos proinflamatorios o antiinflamatorios.

Los eicosanoides actúan en las células a través de receptores de la familia de las proteínas de siete dominios transmembrana acopladas a proteínas G (GPCR, *G-protein coupled receptor*), situados en la membrana plasmática. Los prostanooides interaccionan con receptores IP, FP, DP o EP1-4 en el caso de las prostaglandinas, y TP en el de los tromboxanos [74]. Los leucotrienos reaccionan con los receptores BLT1, BLT2, CysLT1 y CysLT2 [75]. Su caracterización fue farmacológica y, más tarde, basada en métodos de biología molecular.

La acción de los eicosanoides regula un enorme abanico de procesos: inflamación, vasoconstricción, broncoconstricción, quimiotaxis, permeabilidad vascular, regulación de la estimulación sináptica, agregación plaquetaria y otros. Las prostaglandinas PGI₂ y PGE₂ regulan la inflamación aguda en la artritis [76-77] y PGD₂ es secretada masivamente en los ataques de asma [78]. TXB₂ es un potente vasoconstrictor y activador de plaquetas [73]. El leucotrieno LTB₄ induce la infiltración de los leucocitos y la secreción de citoquinas inflamatorias [79], y los LTC₄ y LTD₄ provocan la contracción del músculo liso [80].

En consecuencia, se observa cómo la mayor parte de los potenciales beneficios de las dietas enriquecidas en ácidos grasos de la serie n-3 en lo que respecta a procesos vinculados con la inflamación (y, en cierto modo, con el envejecimiento, dado el estado inflamatorio crónico al que va asociado) vienen dados por su capacidad inhibidora de la síntesis y acción de lípidos eicosanoides derivados del ácido araquidónico.

4. Apoptosis

4.1 Aspectos generales

El proceso mediante el cual una célula emprende activamente un programa destinado a su propia degradación controlada, sin que exista liberación de material celular al medio circundante, se conoce como apoptosis¹.

Aun desconociendo inicialmente las bases moleculares del mismo, dicho proceso y sus consecuencias en el desarrollo y función de los órganos de diversas especies de animales fueron objeto de estudio desde el siglo XIX [81-83]. Más allá de las evidentes implicaciones en procesos de metamorfosis, como por ejemplo ocurre en los insectos, fueron los trabajos de John Sulston, S. Brenner y H. R. Horvitz, en Cambridge, acerca de los linajes celulares en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [84-85] los que crearon un nuevo interés por la idea del destino celular y de la muerte celular programada, que causaba la invariable pérdida de 131 células a lo largo de la vida del animal. Sus investigaciones les valieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 2002. Mientras tanto, Kerr, Wyllie y Currie le daban nombre públicamente al proceso [86] y enriquecían el nuevo campo con sus observaciones en diversos tejidos. La apoptosis se mostraba como un proceso celular necesario en el desarrollo embrionario, en la regulación del sistema inmune y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos [83, 87].

El proceso de apoptosis es activo y está regulado de forma precisa. Como consecuencia de la apoptosis, la célula pierde volumen, el núcleo se rompe, la cromatina se condensa y la membrana plasmática muestra invaginaciones y permite la división de la célula en cuerpos apoptóticos. Finalmente, los restos son fagocitados por células del sistema inmune

¹ Término griego (αποπτωσις) que describe la caída de las hojas de los árboles o de los pétalos de las flores. Fue sugerido en primera instancia por el profesor James Cormack, del departamento de Griego de la Universidad de Aberdeen (Escocia).

debido a la externalización de fosfatidilserina hacia el exterior de la membrana plasmática [87-88].

Varias décadas de investigación han permitido establecer las principales vías de activación de la apoptosis. Nuevos descubrimientos de diferentes modalidades de regulación y ejecución, cuya importancia es dependiente del tipo de estímulo recibido y del tipo celular, entre otras variables, van dibujando un mapa de interacciones relacionadas con la apoptosis cada vez más completo, al tiempo que se hace más difícil establecer rutas unívocas en la señalización de muerte celular programada.

Tradicionalmente, se han descrito dos vías de activación de la apoptosis, la vía extrínseca y la vía intrínseca (**figura 4**). En la vía **extrínseca**, receptores en la membrana plasmática pertenecientes a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), tales como Fas, TRAIL-R1/2 o el propio TNF-R son estimulados por ligandos extracelulares (TNF- α , FasL, TRAIL). Mediante sus “dominios de muerte” (DD, *death domains*) reclutan proteínas adaptadoras necesarias para la transducción de señales de supervivencia o muerte. En el caso de Fas (CD95) y los receptores para TRAIL, se forma un “complejo señalizador inductor de muerte” (DISC) cuando las proteínas adaptadoras como FADD reclutan, a través de sus “dominios efectores de muerte” (DED) a la procaspasa-8 y a la procaspasa-10. Ambas procaspasas llevan a cabo una activación cruzada mediante proteólisis,

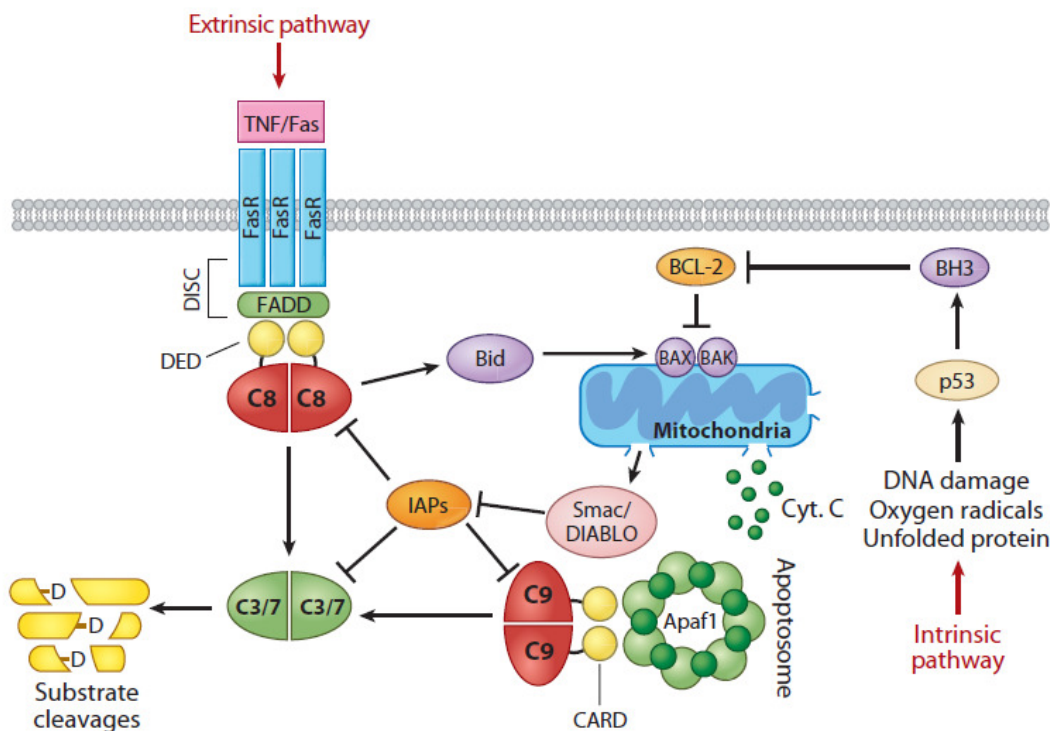


Figura 4. Principales rutas clásicas de señalización apoptótica, iniciadas por daño celular o por señalización externa dirigida a receptores específicos [91].

dando lugar a caspasas activadas, capaces a su vez de procesar y activar a las caspasas efectoras de la apoptosis, principalmente a la caspasa-3.

En la vía **intrínseca**, estímulos intracelulares vinculados principalmente con el daño al material genético pueden provocar la activación de proteínas de la familia Bcl-2 con un carácter proapoptótico. El equilibrio entre miembros proapoptóticos (Bax, Bak, Bid y otros) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 y otros) de esta familia en la membrana externa de la mitocondria condicionará la apertura o no de poros en la misma, y la subsiguiente liberación al citosol de una serie de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria. Entre esas proteínas se encuentra el citocromo *c*, necesario para la formación del complejo conocido como apoptosoma junto a Apaf-1 y a la procaspasa-9 permitiendo, con gasto de ATP, la activación de la caspasa-9 y, a través de ésta, de la caspasa-3, así como de otras caspasas efectoras (-6 y -7).

Paralelamente a las vías dependientes de caspasas, la liberación al citosol de los factores del espacio intermembrana incluye a la endonucleasa G y al factor inductor de la apoptosis (AIF), que llevan a cabo una apoptosis independiente de caspasas, translocándose al núcleo y degradando el material genético.

La apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico (ER) está siendo objeto de intensa investigación (revisada en [89]). El ER es capaz de modular o inducir apoptosis mediante su efecto en el equilibrio de las proteínas de la familia Bcl-2, en el control de la actividad de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) o mediante la acción de caspasas insuficientemente caracterizadas (caspasa-12) o cuya acción en el ER aún no está totalmente explicada (caspasa-8). La relevancia de la apoptosis inducida por estrés del ER está siendo estudiada en enfermedades neurodegenerativas, neoplásicas y metabólicas.

Se han descrito otras rutas capaces de regular la apoptosis, incluyendo las que regulan la acción de factores de supervivencia y crecimiento. Además, la producción de ceramidas a partir de esfingomielina, catalizada por varios tipos de enzimas con actividad esfingomielinasa (como la esfingomielinasa neutra de la membrana plasmática), puede inducir apoptosis mediante mecanismos que aún no son totalmente conocidos [90].

4.2 Caspasas

Las proteasas cisteína-dependientes dirigidas a aspartato o caspasas, son un grupo de enzimas vinculadas a diversos procesos del desarrollo y la diferenciación celular, cuya función más estudiada es la relacionada con la muerte celular programada. Su actividad enzimática se basa en un centro catalítico capaz de acomodar un tetrapéptido diana, en configuración extendida, que debe poseer en primer lugar (P1) un residuo de aspartato. Más de 1000 proteínas diferentes, aproximadamente el 5% del proteoma total de una célula, son susceptibles de procesamiento por parte de alguna caspasa [91].

Las caspasas son sintetizadas en forma de zimógenos precursores, con un prodominio que debe ser eliminado por proteólisis antes de que la enzima pueda alcanzar su configuración activa. Frecuentemente, la activación de las caspasas tiene lugar mediante dimerización de la forma inactiva, activación cruzada por proteólisis y configuración de un heterotetrámero activo [92]. En otras ocasiones, un cambio conformacional por asociación con otros polipéptidos facilita el procesamiento, o bien la ruptura es catalizada directamente por otra proteasa. El prodominio de las caspasas puede contener dominios de reclutamiento (CARD) o dominios efectores de muerte (DED) que facilitan la localización de las procaspasas en los complejos en los que se lleva a cabo la activación de algunas de ellas, como los DISC o el apoptosoma.

Se han descrito en humanos y en roedores aproximadamente una docena de caspasas. Se subdividen en tres grupos, atendiendo a la especificidad que presentan por el cuarto residuo del tetrapéptido diana [93].

- Grupo I. Comprende las caspasas con función inflamatoria -1, -4 y -5 (estas dos últimas, sustituidas en el ratón por la caspasa-11). Poseen un prodominio largo con CARD y presentan mayor afinidad por tetrapéptidos diana que en la posición P4 contienen un residuo de triptófano o de leucina.
- Grupo II. Son caspasas con prodominio reducido que actúan sobre tetrapéptidos con aspartato en la posición P4. Incluye a las caspasas efectoras -3 y -7, capaces de actuar sobre más de trescientos sustratos y sobre casi un centenar, respectivamente.
- Grupo III. Caspasas con un largo prodominio y afinidad por leucina o valina en la P4, como ocurre con las caspasas iniciadoras de la apoptosis humana, -8, -9 (ambas presentes también en ratón) y -10.

Algunos miembros de la familia no pueden ser encuadrados de forma inequívoca en uno de estos tres grupos. Por ejemplo, la caspasa-2, cuyo papel en la apoptosis inducida por

estrés del retículo endoplásmico, comparte homología de secuencia con el grupo I, pero tiene afinidad por aspartato en P4. Análogamente, la caspasa-6, otra caspasa efectora, presenta homología de secuencia y función con el grupo II, pero su afinidad de diana se asemeja a la del grupo III [91].

A continuación estudiaremos más detenidamente las características de las caspasas iniciadoras -8 y -10, así como de la caspasa efectora -3. La caspasa-9 se describirá en el apartado correspondiente al complejo conocido como apoptosoma.

4.2.1 Caspasas-8 y -10

Son caspasas clásicamente catalogadas como iniciadoras de la ruta extrínseca de la apoptosis y, a menudo, consideradas redundantes en su localización y acción. Aunque ambas están presentes en las células humanas, la caspasa-10 no se expresa en roedores [94], motivo por el cual las investigaciones realizadas con modelos murinos, por ejemplo, se han centrado en la caspasa-8. En humanos se ha demostrado la importancia de la caspasa-10 al constatar que su deficiencia es el origen de enfermedades de carácter proliferativo (revisado en [94]).

Tomando como modelo la caspasa-8, su estructura y funcionamiento se corresponde con el mencionado grupo II, presentando un largo prodominio que contiene DED capaces de interactuar con proteínas adaptadoras en los complejos formados en torno a los receptores de ligandos extracelulares [95]. El papel de los dominios DED en el citosol una vez separados de la caspasa activa, así como el de la propia caspasa-8 una vez fuera del DISC, son aún pobremente entendidos.

La procaspasa-8 forma homodímeros al ser reclutada en el DISC, que poseen actividad enzimática suficiente para llevar a cabo un primer paso de proteólisis cruzada, dando lugar a heterotetrámeros con dos subunidades mayores (20 kDa, p18) y otras dos más pequeñas (12 kDa, p10). Tras varios cambios conformacionales y nuevos pasos de proteólisis en los que pueden interactuar varias unidades, la caspasa-8 activa en forma de heterotetrámero es liberada en el citosol y actúa sobre un amplio espectro de dianas.

En las células de tipo I, como los linfocitos, la activación de la caspasa-3 mediada por la caspasa-8 es suficiente para iniciar exitosamente la apoptosis. En las células de tipo II, como los hepatocitos, sin embargo, es necesaria una amplificación de la señal mediante señalización mitocondrial, lo cual se consigue mediante el procesamiento de Bid y la liberación al citosol de las proteínas del espacio intermembrana [96]. Por otra parte, se han sugerido funciones en la regulación de la capacidad de migración y adhesión de la célula por parte de la caspasa-8, que

justificarían el hecho de que aparezca a niveles normales o incluso incrementados en diversos tumores [97].

4.2.2 Caspasa-3 y otras caspasas efectoras

La caspasa-3 es el principal efector de la apoptosis en las rutas dependientes de caspasas, y en ella confluyen la vía extrínseca y la vía intrínseca. Al igual que la mayor parte de las caspasas, para su activación es necesario el procesamiento proteolítico de la procaspasa-3 dimerizada, de manera que se genera un heterotetrámero activo con dos subunidades de 17 kDa y otra dos de 12 kDa.

La proteólisis por caspasa-3 se lleva a cabo sobre la secuencia de aminoácidos DEVDG, entre aspártico y glicina. Se han identificado varios centenares de dianas de la caspasa-3, muy por encima del resto de caspasas efectoras [91], y estudios *in silico* han determinado que varios miles de proteínas serían susceptibles de ser procesadas por esta caspasa [98].

Una de las principales proteínas diana de la caspasa-3 es la ADNasa activada por caspasas (CAD), responsable de la rotura del ADN en los estadios finales del proceso apoptótico [99-100]. En condiciones normales, CAD se encuentra en el citosol, unida a ICAD, un represor que actúa como chaperona. El procesamiento de ICAD por la caspasa-3 permite la migración al núcleo de CAD, donde lleva a cabo la degradación de ADN provocando roturas en los fragmentos internucleosomales. ICAD y CAD también han recibido la denominación de DFFA y DFFB (*DNA fragmentation factor*). La expresión de CAD varía según los tipos celulares. Es alta, por ejemplo, en órganos linfoides como el timo o el bazo [101-103], indicando por tanto una gran importancia de la apoptosis dependiente de caspasas en el sistema inmune, pero sus niveles son mucho más reducidos en otros órganos como el hígado o el riñón, así como en fibroblastos [102-103].

De forma paralela, la activación de la caspasa-3 suprime la capacidad de la célula para reparar los daños en el ADN, pues varias proteínas encargadas de esta función son también procesadas por esta proteasa. La más estudiada de ellas es la poli-(ADP-ribosa)-polimerasa 1 (PARP-1), una enzima nuclear [104] cuya sobreactivación a consecuencia de agentes citotóxicos provoca una respuesta de muerte celular de tipo necrótico. El mecanismo sugerido es el enorme incremento en gasto energético que supone dicha sobreactivación de PARP-1 [105-106], motivo por el cual se considera que la proteólisis de esta enzima por la caspasa-3 tiene más que ver con la preservación de una reserva de energía necesaria para la culminación de la apoptosis que con la supresión de la reparación de ADN.

También son susceptibles de proteólisis algunas subunidades del complejo del proteasoma, con un efecto generalmente inhibitorio de su actividad [107-108], aunque recientemente se ha descrito en algunos tipos celulares, como las fibras musculares, que la caspasa-3 es capaz de incrementar la actividad del proteasoma potenciando el desmantelamiento de las estructuras contráctiles [109]. La caspasa-3 puede actuar sobre su propio inhibidor, XIAP, estableciendo un bucle de retroalimentación positiva que aumenta la eficacia del proceso apoptótico [110]. Entre los sustratos de la caspasa-3 se encuentra una amplia variedad de proteínas de carácter señalizador o estructural, implicadas en diversas rutas de transporte de metabolitos, señalización de supervivencia y otras [111].

Existe una similitud de función de la caspasa-3 con el resto de caspasas efectoras, pero no una redundancia completa de la misma. Los ratones *knock out* dobles para las caspasas -3 y -7 mueren poco después de nacer, pero aquellos que sólo carecen de una de ellas tienen un desarrollo relativamente normal [112]. La importancia relativa de una u otra proteasa depende del tipo de estímulo apoptótico y del tipo celular en el que se produzca [113]. Sin embargo, para algunos rasgos característicos de la apoptosis, como son la proteólisis sobre PARP-1 y la fragmentación del material genético, sólo la caspasa-3, y no la -7, es imprescindible [112].

La caspasa-6, encuadrada dentro de las efectoras desde que se descubrió su homología de secuencia con las caspasas -3 y -7, difiere de éstas en su afinidad por un tetrapéptido diana con la secuencia VEID. Así, está bien definida la función de la caspasa-6 en el desmantelamiento de la estructura nuclear por su acción sobre las laminas o laminas A y C de la lámina nuclear [114], acción que además resulta necesaria para la condensación de la cromatina que tiene lugar durante el proceso apoptótico [115].

Actualmente se está prestando una gran atención al papel de la caspasa-6 en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Huntington o el Alzheimer, especialmente en el proceso de degeneración de los axones, tal y como refleja una interesante y reciente revisión [116].

4.3 Familia de proteínas Bcl-2

Los principales reguladores de la ruta mitocondrial de la apoptosis son las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, que toma el nombre del primer miembro descubierto, la proteína Bcl-2 (*B cell CLL/lymphoma 2*). Se trata de proteínas citosólicas o integradas en la membrana externa mitocondrial (MOM) que, en algunos casos, y gracias a cambios conformacionales, pueden alternar entre ambas localizaciones. Todas ellas comparten en su

secuencia la existencia de dominios de homología Bcl-2 (dominios BH), en distintas combinaciones (**figura 5**, revisado en [117]).

Existen tres grupos o subfamilias de proteínas de la familia Bcl-2:

- Las proteínas antiapoptóticas que contienen cuatro dominios BH, cuya función es preservar la integridad de la MOM. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*) y A1 son los miembros más estudiados de este grupo y, aunque se localizan mayoritariamente en la MOM, pueden encontrarse en el citosol o en el retículo endoplásmico.
- Las proteínas proapoptóticas efectoras, como Bak (*Bcl-2 antagonist killer*) y Bax (*Bcl-2 associated x protein*), también con los dominios BH del 1 al 4, encargadas de desestabilizar la membrana externa mitocondrial y permitir la liberación de factores proapoptóticos del espacio intermembrana.
- Las proteínas proapoptóticas que contienen únicamente el dominio BH3 (*BH3-only proteins*), para las cuales se ha sugerido, a su vez, una subdivisión en dos grupos:
 - Aquellas que, como Bad, Puma, Bmf y Noxa, son capaces de interactuar únicamente con los miembros antiapoptóticos de la familia, reciben el nombre de sensibilizadoras o “desrepresoras”, dependiendo de su mecanismo de acción en cada caso.
 - Aquellas que, como Bid y Bim, interactúan tanto con los efectores como con las proteínas antiapoptóticas, reciben el nombre de activadores directos.

4.3.1 Bcl-2

Bcl-2 fue la primera proteína descubierta en mamíferos con homología secuencial y funcional con Ced-9, un regulador de la apoptosis en *Caenorhabditis elegans*. Su papel en la generación de linfomas, mediante un efecto de supresión de la muerte celular programada, da nombre a toda la familia de proteínas [118]. Posteriormente se observó la desregulación en los niveles de Bcl-2 en un gran número de tipos de tumores, y se descubrió su papel como proteína antiapoptótica.

Bcl-2 se encuentra en la membrana mitocondrial externa, donde ejerce su papel de inhibidor de la permeabilización de dicha membrana. Bcl-2 es capaz de interactuar con proteínas BH3-only, así como con Bax y Bak, conteniendo los estímulos proapoptóticos hasta un cierto umbral, en que la oligomerización de Bax o Bak tiene lugar y se permite la salida al citosol de proteínas del espacio intermembrana [119-120].

Los ratones *knockout* para el gen *Bcl-2* presentan involución del timo y el bazo, así como enfermedad poliquística renal, entre otros fenotipos, como consecuencia de una excesiva apoptosis [121].

4.3.2 Bax

Es una proteína mayoritariamente citosólica, que puede ser activada por otras proteínas (modificación de su conformación por tBid, fosforilación por Akt, ERK1/2, JNK, p38, o inducción de su expresión por p53, revisado en las tablas suplementarias de la revisión de Chipuk, 2011 [117]) en respuesta a estímulos extracelulares o a situaciones de estrés intracelular. Se ha demostrado que, en condiciones normales, una pequeña fracción del contenido celular de Bax se encuentra periféricamente asociada a la membrana externa de la mitocondria, y se produce un constante tránsito entre ésta y el citosol, regulado por Bcl-xL y, probablemente, por otras proteínas de la familia [122]. El mecanismo que regula la migración de Bax a la mitocondria no está totalmente elucidado, aunque se conoce la implicación de factores como p53 [123], prostaglandinas [124] o modificaciones postraduccionales [125]. Se cree que el simple contacto de Bax con la membrana externa podría provocar leves cambios conformacionales, y la propia composición de la membrana y la morfología del orgánulo podrían condicionar sus propiedades receptoras o refractarias hacia Bax [126-127].

A partir de su activación por tBid, Bax es reclutada hacia la membrana externa, en la que se integra y forma oligómeros constituyendo poros que permiten los primeros pasos de

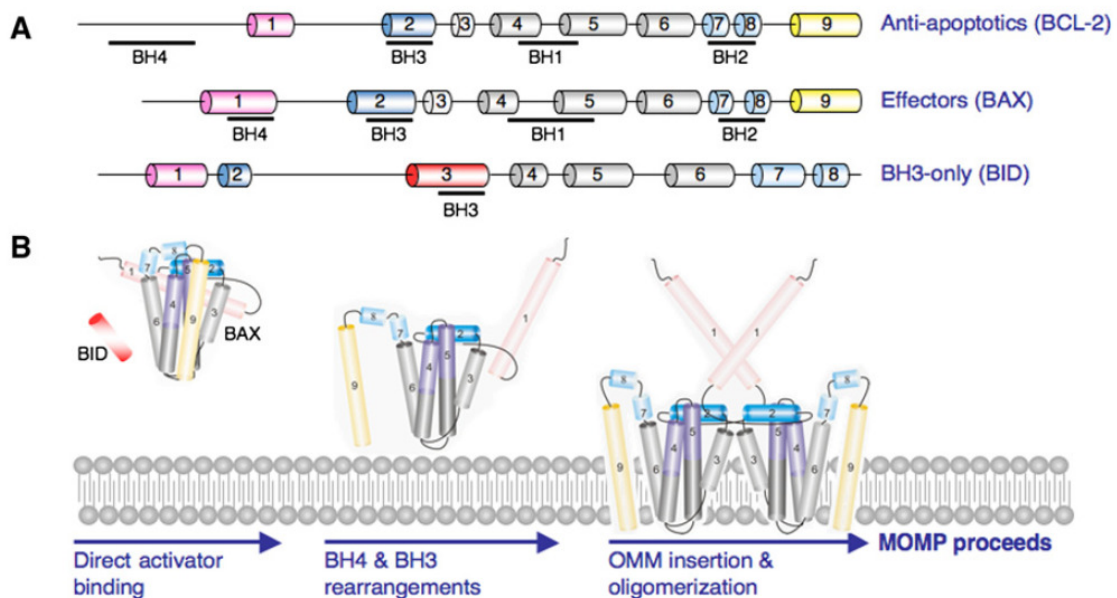


Figura 5. Dominios presentes en los diferentes tipos de proteínas de la familia Bcl-2 (A) y mecanismo de activación de Bax previo a su inserción en la membrana mitocondrial externa (B) [117].

liberación de proteínas del espacio intermembrana, como el citocromo *c*, tal y como se describe más adelante (**figura 5B**) [128].

4.3.3 Bid

La proteína activadora directa Bid es responsable de la transducción de señales de muerte celular procedentes de ligandos extracelulares hasta las mencionadas proteínas reguladoras de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial. Se trata de una proteína citosólica que es susceptible de procesamiento por la caspasa-8, generándose un fragmento de 15 kDa (tBid) que interacciona con Bax, activándola y favoreciendo su integración en la membrana externa, como primer paso hacia la generación de poros en la misma.

Se ha descrito que es necesario que tBid se inserte en la membrana mitocondrial externa para que sea capaz de reclutar y activar a Bax [129]. La afinidad de tBid por la mitocondria viene determinada por el hecho de que sus hélices α centrales se pueden unir a las cardiolipinas, lípidos específicos de la mitocondria y poco abundantes en su membrana externa [130]. Además, se ha identificado una proteína similar a los transportadores mitocondriales de la familia del translocador de nucleótidos de adenina, denominada MTCH2/MIMP, cuya presencia aumenta la eficiencia de la captura de tBid [131].

Sin embargo, Bid es capaz de interactuar también con proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-xL, y se cree que este caso su función no es, como ocurre con Bax, modificar su conformación para favorecer oligomerización, sino permanecer fuertemente unida a dichas proteínas actuando como un represor [132].

4.3.4 Otros miembros de la familia Bcl-2

El papel de diversos miembros de la familia Bcl-2 ha sido estudiado en procesos vinculados, principalmente, al desarrollo y al cáncer. El mapa de interacciones de las proteínas de esta familia es muy extenso y contacta con diversas rutas de señalización procedente de factores de crecimiento, detectores de daños intracelulares, citoquinas y ligandos extracelulares de diversa naturaleza. Las proteínas *BH3-only* Bad, Bim, Bik, Bmf, Hrk, Nix, Noxa y Puma son reguladas en función del daño al ADN, estrés del retículo endoplásmico, choque térmico, ausencia de factores de crecimiento, presencia o ausencia de determinadas citoquinas y otros estímulos [117].

A diferencia de Bax, y a pesar de su homología funcional, la proteína proapoptótica Bak se localiza normalmente en la membrana externa mitocondrial, y la unión de un activador directo del tipo *BH3-only* causa cambios conformacionales que desembocan en la oligomerización de esta proteína [133].

Algunas proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL o Mcl-1, descubiertas con posterioridad a Bcl-2, han mostrado fenotipos con cambios más profundos que ésta. Los ratones que no expresan cualquiera de las dos proteínas mencionadas mueren durante la etapa embrionaria, en el caso de Mcl-1 por imposibilidad de implantación del embrión en su fase de blástula y, en el caso de los animales *Bcl-x^{-/-}*, por apoptosis masiva de neuronas y células hematopoyéticas [134-135].

4.4 Permeabilización de la membrana externa mitocondrial

La mitocondria es el orgánulo encargado de la generación de moléculas con enlaces de alta energía (ATP, trifosfato de adenosina), que las enzimas emplean para el funcionamiento de la práctica totalidad de los procesos celulares.

La producción de ATP es posible gracias a la compartimentalización del orgánulo merced a la existencia de una doble membrana, que definen por lo tanto una matriz mitocondrial, en el interior de la membrana interna, y un espacio intermembrana (IMS), comprendido entre ambas y fundamental en el proceso de fosforilación oxidativa. La acumulación de un gradiente de protones en el IMS con respecto a la matriz, a raíz de la actividad de la cadena de transporte de electrones, permite el funcionamiento de la ATP sintasa y la generación de ATP.

El espacio intermembrana sirve también como reservorio de una serie de moléculas con un papel fundamental en la vía intrínseca de la apoptosis, así como en la apoptosis independiente de caspasas. Su liberación al citosol es considerada como el punto de no retorno en el proceso de muerte celular [136]. El citocromo *c*, además de jugar un papel fundamental en la fosforilación oxidativa, forma parte del apoptosoma junto a Apaf-1 y a la procaspasa-9 [137]. La proteína Smac/Diablo anula la acción de los inhibidores de la apoptosis (IAPs), mientras AIF y EndoG cooperan para producir una apoptosis independiente de caspasas. El suceso que permite la salida de estas proteínas al citosol es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), y sus bases molecular no están aún completamente elucidadas. Se han sugerido dos modelos, que no son totalmente excluyentes, para explicar la salida de proteínas del IMS al citosol [138]. Por un lado, el mecanismo de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT), que mediante la formación

del complejo del poro de transición de permeabilidad (PTPC) permite la liberación al citosol de proteínas de la matriz y del IMS. Por otro, la formación de un canal mitocondrial inducido por apoptosis (MAC), generado por la interacción de proteínas de la familia Bcl-2.

4.4.1 Poro de transición de permeabilidad

El complejo del poro de transición de permeabilidad se compone de un grupo de proteínas entre las que destacan el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), situado en la membrana externa, el translocador de nucleótidos de adenina de la membrana interna (ANT) y la ciclofilina D de la matriz, entre otras [139]. Esta composición tradicionalmente aceptada es objeto de debate, y se ha demostrado que el ANT no es un componente imprescindible [140].

La apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) provoca la despolarización de la membrana mitocondrial interna y un aumento osmótico de volumen de la matriz mitocondrial. Dada la mayor superficie de la membrana interna que forma las crestas mitocondriales, este aumento de volumen provoca la ruptura de la membrana externa y la consiguiente liberación al citosol de las proteínas del IMS [138]. Sin embargo, se ha demostrado que puede haber liberación, al menos parcial, de citocromo *c* sin que exista pérdida de integridad de la membrana externa ni despolarización, dando base a la idea de que existe algún otro mecanismo implicado [141-142] y otorgando al PTP una función preeminente, sobre todo, en los procesos de necrosis celular [143].

4.4.2 Canal mitocondrial inducido por apoptosis

La alternativa al PTP es el mencionado canal mitocondrial inducido por apoptosis (MAC), que consiste en una estructura compuesta por múltiples unidades de Bax y Bak interactuando para permitir la salida de proteínas al citosol. La regulación del MAC, por lo tanto, correspondería casi en exclusiva a las proteínas de la familia Bcl-2, aunque se cree que contiene componentes adicionales [144-145]. Este canal se formaría, según los modelos más aceptados, sin interferir en la estructura o función de la membrana mitocondrial interna.

Muchas de las proteínas de la familia Bcl-2 son estructuralmente similares a las toxinas bacterianas capaces de formar poros en las membranas celulares [146]. Bcl-2, Bax, Bak y Bcl-xL son capaces de formar poros en membranas lipídicas artificiales, pero algunos experimentos de sobreexpresión parecen descartar que los miembros antiapoptóticos de la familia posean esta capacidad *in vivo* [145, 147].

Bax, sin embargo, puede formar oligómeros que constituyen canales independientes de voltaje y que permitirían la salida hacia el citosol de moléculas de hasta 5 nm de diámetro, por encima de los 3 nm calculados para el citocromo *c* [148]. Un gran número de estudios han permitido confirmar que Bax constituye un componente fundamental del MAC (revisado en [145]). La homología funcional y de secuencia con Bak es tal, que ambas proteínas se consideran redundantes en su papel de regulación de la apoptosis, y es necesario silenciar la expresión de ambas para conseguir células resistentes a una gran variedad de estímulos de muerte celular [149].

La liberación de citocromo *c* al citosol ocurre, en ocasiones, con anterioridad a la del resto de proteínas del IMS, que presentan un mayor peso molecular, requiriendo pasos adicionales como la activación de caspasas [150-151], habiéndose sugerido un aumento paulatino en el diámetro del poro generado por Bax/Bak a medida que avanza el proceso de apoptosis. En otros casos, la liberación es prácticamente simultánea [152-153].

En preparaciones *in vitro* de membrana externa mitocondrial en condiciones fisiológicas, una combinación de Bax y Bid puede formar grandes poros, permitiendo el paso de moléculas de hasta 2 MDa y demostrando que en principio no es necesario ningún otro sistema adicional a la propia capacidad formadora de canales de la familia Bcl-2 para liberar al citosol todas las proteínas del IMS [130]. Esta actividad requiere la presencia de cardiolipinas en la capa externa de la bicapa lipídica que constituye la membrana externa, lo cual podría ser un mecanismo regulador adicional, dada la reducida presencia de dicho tipo de lípidos en el mencionado compartimento organular. Aún se discute en qué medida esta demostrada capacidad produce realmente *in vivo* grandes canales, así como la cantidad de monómeros de Bax que participan en cada poro productor de MOMP, aunque se cree que la acumulación de unidades podría alcanzar varios cientos

Curiosamente, en conexión con este último punto, tanto los componentes del PTP como las proteínas de la familia Bcl-2 parecen concentrarse en torno a las zonas de contacto o proximidad entre ambas membranas mitocondriales, y se ha postulado que el verdadero funcionamiento fisiológico de la MOMP consistiría en la colaboración entre ambos sistemas, predominando uno u otro dependiendo de la naturaleza del estímulo apoptótico y del tipo celular [154-155]. Las últimas revisiones sobre el tema [156-157], en todo caso, tienden a minimizar la importancia del PTP en el proceso apoptótico.

4.4.3 Liberación bifásica de citocromo *c*

La salida al citosol del citocromo *c* se produce en dos fases. En un primer momento, la MOMP permite la liberación de las moléculas de citocromo *c* que se encuentran libres en el IMS, o bien unidas de una forma laxa a la membrana interna. Esta primera fase podría permitir la ejecución de algunas funciones del citocromo *c* sin que se produzca muerte celular. A continuación, varios mecanismos de amplificación provocarían una liberación masiva de todo el pool de esta molécula. Dichos mecanismos implicarían, por ejemplo, la oxidación de cardiolipinas por ROS, favoreciendo la formación del PTP, o la actividad de las caspasas -2 y -3, cuyo papel en este proceso aún está comenzando a entenderse [137].

4.5 El apoptosoma

La liberación de citocromo *c* al citosol provoca la formación de un complejo que, aunque en su composición y estructura no guarda semejanza con el DISC que se asocia a los receptores de muerte celular, sí comparte con él la función de aglutinar procaspasas iniciadoras para favorecer su activación y la transmisión de la señal apoptótica. A continuación se detallan los componentes principales de este complejo, llamado apoptosoma.

4.5.1 Citocromo *c*

El citocromo *c* es una proteína periférica de la membrana mitocondrial interna, encargada del transporte de electrones entre los complejos III y IV de la cadena transportadora de electrones. Se sintetiza en el citosol como una cadena de 104 aminoácidos, con una conformación esférica de 3,4 nm de diámetro, y se traslada al IMS donde se asocia con un grupo hemo. Su función de transporte de electrones y su otra función principal, la formación del apoptosoma, radican en diferentes dominios de la proteína, de manera que es posible obtener ratones con un citocromo *c* modificado que tienen una fosforilación oxidativa normal pero cuyos defectos en la apoptosis generan consecuencias similares a los *knock out* para caspasa-9 y Apaf-1 [158].

4.5.2 Apaf-1

El factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) es una proteína multidominio que contiene dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) en su extremo amino-terminal, un dominio de unión a nucleótidos y de oligomerización (NOD) y un dominio WDR carboxi-

terminal con una docena de repeticiones WD40, un tipo de dominio en hélice enrollada β que facilita en eucariotas gran variedad de interacciones proteína-proteína [136].

La unión del citocromo *c* al dominio WDR y de ATP al NOD provoca cambios conformacionales en Apaf-1 dependientes de la hidrólisis de ATP, hasta permitir la generación de un heptámero en anillo que expone los CARD para su reconocimiento por las unidades de procaspasa-9 [159].

4.5.3 Caspasa-9

La caspasa-9 es una proteasa cuyo papel principal en la apoptosis consiste en la activación de la caspasa-3 efectora como consecuencia de la señalización procedente de la vía intrínseca de la apoptosis, a través de la mitocondria. Requiere dimerización y activación cruzada, con lo cual el papel principal del apoptosoma es el aglutinamiento de unidades de procaspasa-9, aumentando así la concentración local de moléculas y facilitando su activación [160].

La caspasa-9 presenta algunas diferencias con las demás caspasas iniciadoras. En primer lugar, solamente es activa mientras se encuentra unida al complejo multimérico. Por otro lado, el llamado bucle de activación, es decir, la secuencia de aminoácidos que une las subunidades mayor y menor de la caspasa-9, es más largo que en las caspasas -8 y -10 y permite el acceso al sitio activo sin precisar de una ruptura proteolítica. La procaspasa-9 es activa desde el momento de su unión con Apaf-1, aunque la proteólisis ocurre de todos modos. Se ha sugerido que el procesamiento de la procaspasa-9 sucede para permitir la regulación inhibitoria por parte de XIAP y, por otra parte, para establecer un “reloj molecular” que determine la duración de la actividad del apoptosoma en función de la cantidad de procaspasa-9 que haya en el citosol. La procaspasa-9 presenta más afinidad por el apoptosoma que la caspasa-9 procesada, permitiendo así la sustitución de las moléculas, que dejan de ser activas al disociarse de Apaf-1 [161].

4.6 Otras proteínas reguladoras de la apoptosis

4.6.1 Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs)

La familia de proteínas IAPs se encuentra conservada en un gran número de organismos, desde levaduras hasta mamíferos, así como en virus. Contienen entre una y tres copias de un dominio llamado repetición IAP de baculovirus (BIR), empleándose la nomenclatura de BIRC1-8 para los miembros de esta familia identificados en humanos [162].

Se ha demostrado *in vitro* la capacidad de estas proteínas de interactuar con las proteasas relacionadas con apoptosis, pero se desconoce el papel real que juegan muchas de ellas en los procesos de muerte celular. La proteína mejor caracterizada y estudiada es el inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X (BIRC4/XIAP), para la cual se ha demostrado una función fisiológica relevante como represor de la apoptosis dependiente de caspasas [163].

XIAP contiene tres dominios BIR y un dominio en “dedo de zinc” llamado RING. La función de los primeros es interactuar con secuencias de unión a IAP (IBM) presentes en las proteínas cuya interacción con XIAP está descrita: sus inhibidores Smac/Diablo y HtrA2/Omi, y sus dianas las caspasas -3, -7 y -9. Por su parte, los dominios RING actúan como ligasas de ubiquitina E3, pudiendo mediar su propia ubiquitinación y la de sus proteínas diana [162].

Se han generado ratones *knock out* para XIAP, sin que existiera un efecto deletéreo tan grave como la muerte embrionaria temprana que se registra al eliminar su homólogo en *Drosophila melanogaster* [164]. El 90% de los carcinomas hepatocelulares (HCC) presentan una expresión incrementada de XIAP [165] y se observa, además, una función protectora de XIAP promoviendo la supervivencia en células altamente especializadas como las neuronas [166] o los cardiomiocitos [167].

En el transcurso del proceso apoptótico, XIAP puede ser procesado por las caspasas efectoras -3 y -7, generando sendos fragmentos proteolíticos que conservan la capacidad inhibitoria, aunque con distinta especificidad. Uno de los fragmentos (que contiene los dominios BIR3 y RING) es capaz de inhibir a las mencionadas caspasas efectoras, mientras que el otro (con BIR1 y BIR2) tiene capacidad inhibitoria sobre la caspasa-9 [168].

Un interesante dato sobre la función de XIAP en la señalización apoptótica salió a la luz con el trabajo de Philipp Jost y otros [96], en el que señala a la capacidad inhibitoria de XIAP sobre la caspasa-3 como el mecanismo que define dos tipos de células en cuanto a sus rutas de muerte celular: aquellas en las que el estímulo extracelular es suficiente para la conclusión exitosa de la apoptosis (tipo I), como ocurre en los linfocitos, y aquellas en la que

el procesamiento de Bid y la amplificación de la señal por la vía mitocondrial es necesaria para la muerte celular (tipo II). La inhibición de XIAP sobre la caspasa-3 impediría la apoptosis a partir de la señal proveniente de la caspasa-8. Sin embargo, la liberación de factores del IMS, algunos de ellos con capacidad para inhibir XIAP, como la Smac/Diablo, permitiría la activación de las caspasas efectoras.

4.6.2 Smac/Diablo

La proteína conocida con los nombres de “segundo activador de las caspasas derivado de la mitocondria” y “proteína de unión a inhibidores directos de la apoptosis, con bajo punto isoeléctrico” (Smac/Diablo) está codificada por genes nucleares pero se encuentra, en condiciones normales, en el espacio intermembrana de la mitocondria. La permeabilización de la membrana externa como respuesta a un estímulo apoptótico permite su salida al citosol, junto con el resto de proteínas del IMS [169]. Una vez en el citosol, Smac/Diablo dimeriza para inhibir a XIAP mediante interacción con sus dominios BIR2 y BIR3, que según hemos visto son los que interactúan con las caspasas -3 y -9, respectivamente. De este modo, Smac/Diablo permite la activación completa de la cascada de caspasas [170]. Se ha detectado una disminución en la expresión de Smac/Diablo en diversos tumores, correlacionando inversamente el nivel de esta proteína con la capacidad de progresión del tumor [171].

4.6.3 HtrA2/Omi

La proteína HtrA2/Omi (*high-temperature requirement*) es uno de los cuatro miembros de la familia Htr que se expresan en ratones y en humanos. HtrA2/Omi es la única proteína, de las cuatro, que se encuentra habitualmente en el espacio intermembrana de la mitocondria, aunque también se ha localizado en el núcleo [172-173]. Se trata de una proteína de 49 kDa sintetizada en el citosol, y que se traslada a la mitocondria gracias a un péptido señalizador. Una vez en el IMS sufre proteólisis y genera una proteína madura que ha perdido los primeros 133 aminoácidos, y que expone en su extremo N-terminal un dominio IBM de unión a proteínas inhibidoras de apoptosis. La liberación de proteínas del IMS permite que ese dominio se una a XIAP y active así, de forma indirecta, a las caspasas -3, -7 y -9.

Se desconoce la función exacta que lleva a cabo HtrA2/Omi en la mitocondria, pero se ha descubierto que los defectos en esta proteína correlacionan con una mayor incidencia de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson [174].

4.6.4 Hsp70 y otras proteínas de choque térmico

En respuesta a una gran variedad de estímulos químicos y fisiológicos, las células son capaces de inducir de forma rápida la producción de una serie de proteínas conocidas genéricamente como proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP), altamente conservadas en la evolución [175]. Se han publicado numerosos trabajos estudiando la función de las proteínas de choque térmico como moduladores de las distintas rutas de la apoptosis, contribuyendo a definir el destino de la célula ante una agresión [176-179].

Las proteínas de choque térmico, ya sean inducibles o de expresión constitutiva, se clasifican según su peso molecular en una serie de familias: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp27 y Hsp10. El término común que las agrupa a todas ellas es el de chaperonas moleculares, y sus funciones básicas son el control del correcto plegamiento de los polipéptidos sintetizados (y, si es posible, su rectificación), la regulación de la degradación de proteínas y el traslado de las proteínas a las localizaciones subcelulares que indiquen sus péptidos señalizadores [180].

La proteína inducible por estrés Hsp70, el componente más estudiado de la familia Hsp70, contribuye a la atenuación de la señalización apoptótica a diversos niveles. Inhibe la translocación de Bax a la mitocondria [181-182], así como la activación de Bid [183], reduciendo la liberación de citocromo *c* al citosol [184]. En un punto más avanzado de la ruta intrínseca, inhibe la formación del apoptosoma mediante interacción con Apaf-1 [185-186], aunque no está aclarado si lo hace impidiendo la oligomerización de dicha molécula, o causando que el oligómero tenga una conformación incompatible con la unión de la procaspasa-9. Se ha demostrado también que Hsp70 inhibe las cascadas de kinasas inducidas por estrés [187-188] así como la función de p53 [189].

Recientemente se está avanzando en el conocimiento de la importancia que presenta Hsp70 en la inhibición de la apoptosis en el desarrollo de tumores [190]. La sobreexpresión de Hsp70 es suficiente para inducir linfomas en ratones [191] y su silenciamiento hace a las células sensibles a la apoptosis en varios modelos tumorales [192]. Un mayor nivel de Hsp70 es causa de mal pronóstico en neoplasias humanas [193], y se cree que esto se debe a sus funciones antiapoptóticas [194].

En esta línea, y adelantándonos al siguiente epígrafe, se está dando una gran importancia a otro punto de represión de la apoptosis por parte de Hsp70: la apoptosis independiente de caspasas. Tras la liberación de AIF al citosol, se ha demostrado que Hsp70 es capaz de secuestrar esta proteína impidiendo su traslado al núcleo y, por lo tanto, la ejecución de su función como efector de la apoptosis [195]. El silenciamiento de Hsp70 es

suficiente para sensibilizar a las células de hepatoma HepG2 ante fármacos quimioterapéuticos y para aumentar los niveles de apoptosis inducida por AIF [196].

4.7 La apoptosis independiente de caspasas

Como ya se ha señalado, varias proteínas del IMS (el factor inductor de la apoptosis, AIF, y la endonucleasa G) son capaces de iniciar un programa de degradación del material genético de la célula, una vez liberadas al citosol y trasladadas al núcleo, aunque las vías dependientes de caspasas se hallen reprimidas o inactivadas.

4.7.1 Factor inductor de la apoptosis (AIF)

El factor inductor de la apoptosis (*apoptosis-inducing factor*, AIF) es una flavoproteína transmembrana de la membrana mitocondrial interna, de unos 67 kDa [197]. Aunque sus funciones en la mitocondria no están totalmente aclaradas, se ha observado que interviene en el equilibrio redox del orgánulo, poseyendo actividad NADH-oxidasa [198]. Se ha sugerido que podría jugar algún papel como estabilizador del complejo I, y aún no está claro si es únicamente una enzima antioxidante o interviene de algún modo más directo en la cadena de transporte de electrones [199].

En contra de la idea inicial acerca de su existencia como proteína soluble en el IMS, es tras la llegada de un estímulo apoptótico y de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa cuando una proteasa, probablemente una calpaína o una catepsina, escinde el dominio transmembrana de AIF, liberando la proteína y permitiendo su salida al citosol [200-201].

Tras liberarse al citosol, AIF puede tener más de un destino. Su papel mejor estudiado lo realiza en el núcleo, al cual se traslada tras asociarse con la ciclofilina A, cuya participación se considera esencial para la función apoptótica de AIF [202]. Según investigaciones con sus ortólogos en *Caenorhabditis elegans*, una vez en el núcleo AIF (que no tiene actividad endonucleasa *per se*) interaccionaría con la endonucleasa G, también procedente del IMS, permitiendo su acción de degradación del ADN [203].

Se están realizando descubrimientos interesantes en lo referente a la actividad de AIF en otras localizaciones de la célula. Por ejemplo, en la membrana plasmática es capaz de reclutar un tipo de flipasa, la llamada “escramblasa” 1 (SCRM-1, del inglés *scramble*, mezclar), que permite que moléculas de fosfatidilserina, fosfolípidos que habitualmente se encuentran

en la cara interna de la bicapa lipídica, queden expuestos al exterior [204-205]. Esta es una señal estimuladora de fagocitosis, el destino de las células apoptóticas.

Además, se sabe que AIF se une a una subunidad del factor de iniciación de la traducción en eucariotas 3 (eIF3g), deteniendo la síntesis de nuevas proteínas durante la apoptosis.

Existen discrepancias acerca de mecanismos adicionales relacionados con la liberación de AIF, ya que algunos grupos han señalado como necesaria la actividad de alguna caspasa para permitir la salida de AIF y EndoG al citosol, requerimiento que no es tal en el caso del citocromo *c*, Smac/Diablo y HtrA2/Omi [150], mientras que otros investigadores no han podido reproducir esta circunstancia en otros modelos [205-206]. La enzima PARP-1, cuya función se comentó en el apartado dedicado a la caspasa-3, es capaz de activar una vía apoptótica independiente de caspasas mediante la liberación de AIF [207].

4.7.2 Endonucleasa G

La endonucleasa G (EndoG) es una nucleasa mitocondrial de 30 kDa del espacio intermembrana, donde se cree que está unida a la membrana interna [208]. Al igual del resto de proteínas del IMS vinculadas a la apoptosis, es liberada al citosol tras la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y su transporte al núcleo permite la degradación del material genético de una forma independiente de la actividad de las caspasas [209].

EndoG actúa de forma inespecífica sobre cualquier tipo de ácido nucleico, con preferencia por el ADN de cadena simple. Incluso en el caso de ADN de cadena doble, EndoG lleva a cabo roturas en una sola cadena [210].

El significado fisiológico de la acción de EndoG en cada tipo celular en mamíferos es por ahora poco conocido. Incluso, mientras algunos grupos han establecido que los ratones *knockout* para EndoG no presentan fenotipo alguno [211-212], un estudio anterior mostraba el requerimiento de esta enzima durante el desarrollo embrionario [213]. La endonucleasa mitocondrial podría participar en procesos como el daño por isquemia cerebral [214-215] o la atrofia muscular [216-217].

Se ha sugerido que la acción de EndoG podría sustituir parcialmente a la de la ADNasa activada por caspasas (CAD) en aquellas células, como hepatocitos y neuronas, en las que existe una gran cantidad de mitocondrias y una expresión reducida de CAD [103].

EndoG está presente en los hepatocitos de rata y ratón, así como en líneas celulares de hepatoma [218-219]. En humanos, se observa una tendencia a la pérdida de la expresión de EndoG en casos de carcinoma hepatocelular [220].

4.8 Enzimas con actividad esfingomielinasa y apoptosis

Las esfingomielinasas son un grupo de enzimas cuya actividad común consiste en la hidrólisis del enlace fosfodiéster de la esfingomielina, separando la fosforilcolina de la ceramida, molécula que constituye un importante mensajero celular en procesos vinculados a la inflamación o a la muerte celular programada, entre otros [90]. Según su pH óptimo, se diferencian varios tipos de enzima. La esfingomielinasa alcalina (bSMase) se encuentra principalmente en el sistema digestivo, y contribuye a la digestión de lípidos [221].

El gen *Smpd1* puede generar varios tipos de esfingomielinasa ácida (aSMase): una enzima lisosomal; otra destinada a secreción, que interviene en el metabolismo de lípidos circulantes y ha sido relacionada con la aterosclerosis [222] y una última que contribuye a la formación del DISC en torno a los receptores de muerte celular como Fas [223] (revisado en [224]). Una de estas dos isoformas sería responsable de la producción de ceramida a partir de la esfingomielina de la cara externa de la membrana plasmática [225]. La actividad aSMase es también importante, por ejemplo, en la apoptosis inducida por TNF- α en hepatocitos [226].

Por último, existe una familia de esfingomielinasas neutras dependientes de magnesio (nSMase). La nSMase1 (codificada por el gen *Smpd2*) es una proteína integral de membrana ubicua en el organismo, que se localiza en el núcleo, en el retículo endoplásmico, en el Golgi y en otros orgánulos [90]. Sus funciones son poco conocidas, ya que el ratón knockout para este gen no muestra anomalías en el metabolismo de esfingolípidos ni enfermedades vinculadas al almacenamiento de lípidos [227]. Su sobreexpresión tampoco altera dichas rutas, ni proporciona una capacidad elevada de respuesta apoptótica [228], ni es responsable de la generación elevada de ceramidas en la línea celular Jurkat al inducirse apoptosis por receptores de muerte [229]. Sin embargo, la inhibición de nSMase1 por ARN antisentido en la línea de hibridoma de células T 3DO provoca una reducción en la tasa de apoptosis inducida por el receptor de las células T (TCR) [230]. Se ha demostrado también el control por esta enzima de la muerte celular dependiente de ceramida y caspasas en embriones de pez cebra [231].

La enzima mejor caracterizada del grupo es la nSMase2, responsable de la mayor parte de la actividad esfingomielinasa neutra. Es una cadena de 655 aminoácidos, con dos segmentos hidrofóbicos y dos residuos de serina palmitoilados, que son importantes para su

localización en la membrana plasmática, donde se cree que realiza su función [232-233]. Puede encontrarse en otros orgánulos, pero se traslada al lado citosólico de la membrana plasmática en respuesta a la estimulación con TNF- α , especies reactivas de oxígeno o al alcanzarse la confluencia en cultivos celulares. Se expresa especialmente en el cerebro pero actúa y responde a estímulos en otros muchos tejidos. Es inhibida por ácidos grasos insaturados y fosfolípidos aniónicos [234].

La nSMase2 posee tres tipos de funciones principales: regulación de la respuesta a señales de inflamación, control de la proliferación celular y respuesta a estrés [90]. Los ratones con el gen *smpd3* inactivado presentan graves defectos óseos, dentales y un fenotipo similar al enanismo [235-236]. En lo referente a la apoptosis, se ha demostrado que la nSMase2 puede inducir apoptosis en músculo liso aórtico [237], oligodendrocitos [238], línea celular HAE de epitelio amniótico [239] y epitelio bronquial [240], entre otros tipos celulares. Participa también en la apoptosis inducida por quimioterapia y el control del crecimiento y diferenciación postnatal [235, 241].

La nSMase3 (del gen *Smpd4*) fue descubierta más recientemente [242] y presenta una reducida homología de secuencia con las anteriores. Se localiza en el retículo endoplásmico y en el Golgi y su transcripción es susceptible de activación por TNF- α y por agentes genotóxicos en células de cáncer de colon, así como reprimida por p53. Su expresión disminuye en varios tipos de tumores primarios [90]. Pese a estar presente en todos los tejidos, destaca su alto nivel de expresión en músculo esquelético y cardíaco [243].

Existe otra enzima, la MA-nSMase, una esfingomielinasa neutra mitocondrial de reciente descubrimiento, y su expresión es más alta en testículos, páncreas y tejido adiposo [244].

El aumento en los niveles celulares de ceramida se considera suficiente para inducir apoptosis por sí mismo [245], ya se produzca como consecuencia del incremento en la generación de ROS, a partir de procesos dependientes de caspasas, influyendo sobre la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa o regulando a la familia Bcl-2 [103, 246]. Otros esfingolípidos derivados de la ceramida pueden activar kinasas que activen algunos miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 mediante la fosforilación de proteínas de la familia 14-3-3 o influir en la ruta de las MAP kinasas [246].

La ceramida es capaz también de activar las “scramblasas” encargadas de externalizar la fosfatidilserina de la membrana plasmática, favoreciendo la fagocitosis de la célula apoptótica [247].

4.8.1 *Esfingomielinasas neutras y coenzima Q*

La coenzima Q es un lípido compuesto por un anillo benzoquinónico unido a una larga cola isoprenoide cuya longitud varía según las especies, predominando en humanos la coenzima Q₁₀ (diez unidades de isopreno) y en roedores la coenzima Q₉. Su función principal la realiza en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial interna, siendo reducida por los complejos I y II y oxidada por el complejo III, pasando alternativamente del estado oxidado (en el que recibe el nombre de ubiquinona) al reducido (ubiquinol), dependiendo de la aceptación y cesión de electrones en los carbonos 1 y 4 del anillo quinónico.

La coenzima Q cumple, además, diversas funciones en el metabolismo (revisadas en [248]) entre las que cabe destacar su papel como antioxidante, tanto en la mitocondria como en el sistema de protección del equilibrio redox de la membrana plasmática [249].

Atendiendo a su papel accesorio en algunas rutas de apoptosis, además de su intervención indirecta mediante la contención de las ROS, se ha descrito que la coenzima Q inhibe la actividad esfingomielinasa neutra en la membrana plasmática, reduciendo la producción de ceramida y, por tanto, limitando la señalización proapoptótica [250-252].

4.9 Ácidos grasos poliinsaturados y apoptosis

Según ponen de manifiesto investigaciones relativamente recientes, los ácidos grasos poliinsaturados pueden ser moduladores de los procesos de muerte celular, y ejercer una influencia en la aparición y desarrollo de enfermedades vinculadas a los mismos, como el cáncer o los procesos neurodegenerativos [253].

En lo referente al AA, los eicosanoides derivados de él promueven la supervivencia celular, la angiogénesis y la metástasis en tumores, en los que es común encontrar sobreexpresión de las enzimas COX y LOX [254]. Se ha sugerido que, además de regular estos aspectos, la alta actividad de estas enzimas permite a las células evitar la apoptosis mediante la reducción de los niveles de AA intracelular no esterificado [255]. Algunos trabajos han mostrado la existencia de apoptosis inducida por AA en una vía dependiente de liberación de citocromo *c* al citosol y actividad caspasa-3 (revisado en [253]).

Los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 ejercen una doble función beneficiosa en la regulación de la apoptosis en las enfermedades anteriormente mencionadas. Mientras que promueven la apoptosis en células cancerosas y en el sistema inmune [256-257], inhiben

la apoptosis en el sistema nervioso central y el endotelio de vasos sanguíneos (lo cual se relaciona con beneficios en situaciones de aterosclerosis [258-259]).

El tratamiento con EPA en células Ramos de linfoma incrementa la actividad de las caspasas -3 y -9 (no la caspasa-8) [260], y en células HL-60 de leucemia estimula la liberación de citocromo *c* y las actividades caspasa-8 y caspasa-9 [261]. En células Caco-2 de cáncer de colon, el DHA aumenta la actividad de las caspasas -8 y -9 y la liberación de citocromo *c* [262]. En esa y otras líneas celulares de cáncer de colon, tanto el DHA como el aceite de pescado en general son capaces de regular la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, potenciando las proteínas proapoptóticas como Bak y disminuyendo los niveles de las antiapoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-xL [263-265].

Otros resultados son aparentemente contradictorios entre sí, a falta de un conocimiento más detallado de la acción de cada PUFA sobre las diferentes rutas. Los PUFA n-3 pueden inducir apoptosis en células Jurkat de leucemia y células de cáncer de mama mediante un incremento en la actividad esfingomielinasas neutra y liberación de ceramidas [266-267], mientras que inhiben la apoptosis y la liberación de ceramida en linfocitos T normales [268].

Se ha probado que el DHA es antiapoptótico en neuronas, interpretándose como un efecto protector frente a la neurodegeneración, posiblemente a través de la generación de su derivado, recientemente descubierto, neuroprotectina D₁ [269].

A pesar de todas estas observaciones, aún no se dispone de una explicación simple y unificadora del mecanismo de acción de los PUFA n-3 sobre tal cantidad de rutas vinculadas a la apoptosis. La modificación de la fluidez de las membranas, la sensibilidad a la peroxidación lipídica y la modulación de la generación de derivados eicosanoides pueden contribuir en distintas proporciones y a través de distintas rutas señalizadoras. El control de la expresión génica por los ácidos grasos libres mediante la unión a factores de transcripción de la familia PPAR puede estar implicado en dichos mecanismos. También son necesarios más estudios acerca de su función, más allá de procesos patológicos, para entender su capacidad de modulación de la apoptosis en los órganos sanos o en procesos de envejecimiento.

5. Músculo esquelético y envejecimiento

El músculo esquelético es el tipo más abundante de músculo estriado presente en los vertebrados. Su inserción en los huesos y su innervación por neuronas motoras del sistema cerebroespinal permiten el movimiento del cuerpo de manera voluntaria.

5.1 Histología

Las células que componen este tejido se denominan fibras musculares. Son multinucleadas y extremadamente alargadas, y se hallan agrupadas por tejido conjuntivo formando fascículos de fibras. El tejido conjuntivo (endomisio, perimisio o epimisio según la cantidad de fibras comprendidas, desde una fibra individual hasta un músculo completo) sirve como elemento de cohesión del músculo y facilita la innervación y la irrigación de las fibras.

Las fibras contienen, a su vez, miofibrillas musculares que, vistas longitudinalmente y en conjunto al microscopio electrónico, presentan una estriación lateral como consecuencia de la disposición de los miofilamentos delgados y gruesos, de actina y de miosina, respectivamente, que contienen. La apariencia al microscopio electrónico de dichos grupos de filamentos, así como el efecto de superposición de unos sobre otros, genera una serie de bandas claras y oscuras que definen la unidad básica de la contracción muscular.

La sarcómera comprende bandas I (más claras, con filamentos de actina) y bandas A (más oscuras, con miosina y actina superpuestas). En el centro de la banda I aparece una línea Z (o disco Z, al ser tridimensional), punto de conexión entre filamentos de actina de sarcómeras contiguas. Las bandas Z delimitan el límite de cada sarcómera. El desplazamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina, gracias a la propiedad de articular uno de sus extremos, de forma globular, permite la contracción.

Las mitocondrias son abundantes, y se puede distinguir una población interfibrilar y otra subsarcolemal, por encontrarse inmediatas a la membrana plasmática o sarcolema. Las propiedades bioquímicas y morfológicas de ambas subpoblaciones son diferentes [270].

Junto a las fibras musculares, se dispone otro tipo celular conocido como células satélite o mioblastos, con un escaso citoplasma y gran cantidad de ribosomas. Poseen capacidad proliferativa, siendo capaces de diferenciarse y sustituir a fibras musculares dañadas o de fusionarse con las ya existentes.

5.2 Inervación y contracción

La inervación de las fibras musculares esqueléticas tiene lugar a través de fibras nerviosas mielínicas, cuyo cuerpo celular se encuentra en los núcleos motores del tronco encefálico o en el asta anterior de la médula espinal. Poco antes de alcanzar la célula muscular, la vaina de mielina sobre el axón se pierde, quedando simplemente un recubrimiento de células de Schwann, que lo protegen hasta la sinapsis o placa motora, dividida a su vez en unidades sinápticas en las que una de las ramas en que se divide terminalmente el axón entra en contacto con una depresión en el sarcolema.

El neurotransmisor liberado por las vesículas presinápticas es la acetilcolina, y el sarcolema posee gran cantidad de receptores en cada unidad sináptica, formados por oligómeros de 250 kDa. El tráfico de vesículas es análogo al de otras uniones sinápticas, y la liberación de la acetilcolina en la placa motora provoca una despolarización en el sarcolema que recorre la fibra muscular generando la contracción mediante el desplazamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina.

5.3 Tipos de fibras musculares esqueléticas

Históricamente se han diferenciado, según sus propiedades, las fibras musculares rojas y blancas, asociando las primeras con la contracción lenta y la resistencia a la fatiga y las segundas con la contracción rápida. Actualmente se mantiene una división genérica entre las fibras de tipo I, de contracción lenta, y las de tipo II, de contracción rápida, aunque existen subdivisiones en función de las distintas isoformas de miosina presentes y las características de las fibras varían entre organismos relativamente cercanos en la filogenia como son el hombre y los roedores.

Entre los principales músculos de las extremidades traseras del ratón, según un estudio realizado en la línea C57BL6J, el gastrocnemio presenta una predominancia del 95% en fibras del tipo II, de diversos subtipos. En el sóleo, por el contrario, la proporción de fibras de tipo I aumenta hasta cerca del 35% [403].

5.4 Modelo de enfermedad vinculada al envejecimiento en un órgano postmitótico: la sarcopenia

La sarcopenia es la pérdida de masa y función muscular con el envejecimiento. A pesar de la dificultad que ha entrañado la elaboración de un criterio diagnóstico en humanos a lo largo de la historia [271-272], la sarcopenia se considera uno de los factores más determinantes de la llamada “fragilidad” o *frailty*, un indicador de la vulnerabilidad de una persona de edad avanzada ante situaciones de estrés biológico o problemas de salud [273].

La pérdida de masa muscular (por disminución del número de fibras y del diámetro de las restantes) va acompañada por una menor velocidad de la contracción, como consecuencia de una pérdida más acusada de las fibras de tipo II, de contracción rápida [274]. En ratas, se ha cifrado en torno al 30% la disminución del área en cortes transversales de músculo esquelético, como media, además de incrementarse el contenido fibroso y adiposo de la fibra muscular [275].

Aunque se ha sugerido la falta de uso como uno de los desencadenantes de la sarcopenia, los cambios en la composición del músculo apuntan hacia una denervación selectiva de las fibras tipo II, que lleva a su degeneración [276]. La tasa de reinervación y regeneración muscular por parte de las células satélites no es suficiente para compensar la pérdida, y como consecuencia la masa muscular se reduce y la velocidad de contracción baja.

Se ha conseguido recuperar la tasa de sustitución de fibras musculares al transplantar músculo de ratones viejos a ratones jóvenes, devolviendo a las células satélite su potencial proliferativo. Asimismo, las células satélites de animales viejos pueden ser inducidas a diferenciación por el suero de animales jóvenes, sugiriendo que existen factores ambientales externos al propio músculo que regulan este proceso. Se cree que el proceso de inflamación crónica asociado al envejecimiento explicaría estas observaciones [277-278].

La reducción de los niveles de factores de transcripción asociados a la regeneración muscular, y la expresión de proteínas inhibitoras de la diferenciación (Id) que, a pesar de estimular la proliferación de células satélites, inhiben su maduración a fibras musculares, podrían ser también factores que aceleren la degeneración muscular [279].

5.4.1 Mecanismos de la degeneración muscular: apoptosis mionuclear

Las bases moleculares de la pérdida de función muscular y de la desaparición de fibras musculares responden a varios procesos.

Por un lado, se ha descrito que la pérdida de fuerza por unidad de área transversal del músculo es mayor que el nivel de atrofia muscular, es decir, de pérdida de fibras funcionales. Esto indicaría que en las fibras que permanecen activas, existen modificaciones que implican una menor capacidad de contracción [280]. Un incremento en los niveles de ROS podría provocar la oxidación de las moléculas de miosina, comprometiendo la efectividad del mecanismo de contracción molecular [281]. Por otra parte, la desregulación del metabolismo de la glucosa con la edad resulta relevante, ya que se ha demostrado que las moléculas de miosina unidas a glucosa experimentan similares pérdidas en su funcionalidad [282].

Otros procesos cuya intervención se ha venido proponiendo desde hace varios años son la autofagia y los mecanismos de degradación proteasomal [283]. Algunas ubiquitina ligasas se encuentran sobreexpresadas en procesos de atrofia muscular [284-285], y su regulación depende de proteínas FoxO, al igual que la vía de autofagia que implica a FoxO3 y Bnip3 [286-287].

Sin embargo, numerosos trabajos han estudiado el papel que juega la apoptosis de las fibras musculares en la sarcopenia [288-296]. El incremento de una gran variedad de marcadores apoptóticos, entre los cuales se incluye la detección por TUNEL de núcleos apoptóticos, el aumento en la actividad enzimática y en los niveles de proteína de los fragmentos activos de caspasas señalizadoras y efectoras, así como una proporción entre los miembros de la familia Bcl-2 tendente a la apoptosis, ha quedado de manifiesto en experimentos sobre denervación muscular, sobre atrofia por falta de uso y sobre envejecimiento (revisado en [297]). Como se ha descrito anteriormente, la confluencia de estos tres factores se considera importante, decisiva en algunos casos, en la aparición y desarrollo de la sarcopenia.

La apoptosis muscular tiene algunas características especiales dado el carácter multinucleado de la célula. La señalización apoptótica tiende a producir la muerte de núcleos individuales dentro de la fibra y a la pérdida de una parte proporcional del contenido celular, llevando a una atrofia de la fibra más que a una destrucción completa de la célula [272]. Las mismas rutas que activan la apoptosis pueden regular también la degradación proteica en la fibra muscular en condiciones catabólicas [298-299].

La vía extrínseca de la apoptosis, iniciada principalmente por TNF- α , es estimulada con el envejecimiento en músculos ricos en fibras de tipo II (*vastus lateralis*), mientras que el

sóleo, que contiene más fibras de tipo I, mantiene activa la ruta de supervivencia de NF- κ B [290].

En lo referente a la regulación mitocondrial de la apoptosis, los datos disponibles resultan contradictorios. Varios estudios realizados en ratas han señalado que se incrementa la ratio entre proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas [300-302], mientras que en otros ese aumento no sucede [216, 303] o incluso se invierte, como ocurre al medir los niveles de expresión de Bcl-2 y Bax en el músculo *plantaris* de ratas jóvenes y viejas [304]. Se cree que las variaciones en el equilibrio entre miembros de la familia Bcl-2 también pueden ser específicas de cada músculo [305]. Existe una mayor susceptibilidad a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa en el músculo esquelético de animales viejos [306], aunque la relevancia de este hallazgo ha de enmarcarse en la discutida importancia del complejo del poro de transición de permeabilidad en el proceso apoptótico.

Atendiendo a la formación y actividad del apoptosoma, los resultados son aún más discrepantes, dividiéndose de nuevo entre aquellas investigaciones que han encontrado un aumento en la liberación al citoplasma de citocromo *c* y/o una mayor actividad caspasa-9 [291, 303, 307-308] y los que no detectan tal incremento [216, 288-289, 302].

Esta serie de resultados no concluyentes han llevado a pensar que en la degeneración muscular juega un importante papel la apoptosis independiente de caspasas, mediada principalmente por AIF y EndoG. Este tipo de apoptosis permitiría la eliminación selectiva de algunos núcleos de la fibra muscular, sin el desmantelamiento general de la célula mediado por las caspasas. Se ha constatado una inducción de la vía independiente de caspasas en varios estudios, en los que se han comprobado unos mayores niveles citosólicos y nucleares de AIF y EndoG en diversos músculos como el sóleo y el gastrocnemio en ratas de edad avanzada [216-217, 288, 304].

6. Hígado y envejecimiento

El hígado es uno de los órganos más importantes en lo referente a la actividad metabólica de los vertebrados. Presenta una gran diversidad de funciones, al integrar el procesamiento de los nutrientes recibidos a través de la ingesta con el almacenaje de energía en forma de glucógeno, controlando así la homeostasis de los niveles de glucosa. Tiene una importante función detoxificadora frente a un amplio espectro de metabolitos potencialmente perjudiciales, así como asimiladora de fármacos. La secreción de bilis es esencial para los procesos digestivos, por lo que respecta a la incorporación de los lípidos de la dieta. Asimismo, el hígado produce entre el 25 y el 50% de la linfa humana.

El órgano presenta un parénquima compuesto principalmente (80%) por células conocidas como hepatocitos, poliédricas y dispuestas en lobulillos hepáticos en torno a una vena central. La arteria hepática irriga el hígado y permite la llegada de oxígeno a los hepatocitos, aunque la mayor parte de la sangre que llega al órgano lo hace a través de la vena porta, procedente del tracto gastrointestinal, con el objetivo de que el órgano regule adecuadamente el aporte de nutrientes procedentes de la dieta.

Aunque en condiciones normales la tasa de división de los hepatocitos es muy reducida [309], el hígado presenta una enorme capacidad de regeneración.

6.1 Modelo de enfermedad vinculada al envejecimiento en un órgano proliferativo: carcinoma hepatocelular

El carácter potencialmente mitótico del hígado hace de los hepatocitos un buen modelo celular en el que estudiar el equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular programada. La enfermedad neoplásica más frecuente en el hígado es el hepatocarcinoma celular (HCC). En humanos, es la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, y se asocia en la gran mayoría de los casos (70-90%) a procesos crónicos como el alcoholismo o las infecciones víricas por hepatitis B y C [310]. Sin embargo, adicionalmente, el envejecimiento es un factor de riesgo que aumenta la prevalencia de la enfermedad [311]. Además, el establecimiento de una cirrosis como consecuencia de alguno de los factores mencionados aumenta considerablemente el riesgo de desarrollar HCC [312].

El daño hepático generado por estos agentes, tanto en humanos como en ratones (principal modelo de estudio para esta enfermedad), tiene como consecuencia un proceso

inflamatorio con liberación de diversas citoquinas proinflamatorias y un incremento en la generación local de especies reactivas de oxígeno. La cronicidad de la enfermedad provocará episodios periódicos de inflamación e incremento de los procesos de muerte celular, aunque también una acumulación de hepatocitos dañados y progresivamente resistentes a la apoptosis como consecuencia de la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas [313]. Algunas células desarrollarán capacidad tumorigénica y, en una fase de proliferación expansiva, provocarán la enfermedad.

Así, y teniendo en cuenta que en distintos tumores puede variar el conjunto de proteínas cuya expresión se encuentra modificada, la señalización apoptótica en el HCC se encuentra desregulada en diversos puntos. Dentro de la familia Bcl-2 se ha encontrado una sobreexpresión de Mcl-1 y Bcl-xL en un gran porcentaje de casos [314-315], así como una disminución de los niveles de Bax y Bcl-xS [316], y de algunas proteínas *BH3-only*, como Bid, en el caso de hepatocarcinomas asociados a infecciones víricas [317]. Como ya se ha dicho, XIAP se encuentra sobreexpresado en la mayoría de los tumores hepáticos [165], junto con otros genes de la misma familia de inhibidores de la apoptosis [318].

Por lo que respecta a la señalización extracelular, las células del HCC se vuelven resistentes a la apoptosis inducida por ligandos mediante la reducción de los niveles de proteínas necesarias para la transducción de señales, como FADD o FLICE [319], por la activación de inhibidores competitivos de la caspasa-8, como c-FLIP [320] o por el bloqueo de la expresión de los propios receptores de muerte celular como Fas o TRAIL-R2 [319, 321-322].

Las rutas que promueven la supervivencia celular son, por el contrario, más activas en las células transformadas. La señalización proinflamatoria asociada tanto al envejecimiento como a los principales factores causales de HCC promueve la acción de NF- κ B, regulador de Bcl-xL y XIAP, entre otras muchas proteínas, a través de citoquinas como el TNF- α [165, 314, 323]. La transducción de señal a partir de receptores de factores de crecimiento como EGF o IGF-1 [324-325], la ruta PI3K/Akt [326] y las proteínas Ras [327] también se encuentran frecuentemente alteradas.

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Debido a la importancia de la membrana plasmática, las membranas mitocondriales y los diferentes tipos de ácidos grasos en los procesos de muerte celular, consideramos que la alteración de la composición lipídica de las membranas, a través de intervenciones sobre la dieta, puede modular los efectos de la restricción calórica sobre los sistemas de señalización apoptótica durante el envejecimiento. Dado el diferente sentido fisiológico de la apoptosis en tejidos de naturaleza mitótica y postmitótica, planteamos que las potenciales acciones de la restricción calórica y de las alteraciones en el componente graso de la dieta serán específicas de tejido.

En consecuencia, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es estudiar las alteraciones de los sistemas de señalización apoptótica de la membrana plasmática y la mitocondria en el hígado y el músculo esquelético de ratones sometidos a restricción calórica con tres tipos de componente graso, con diferente grado de insaturación: manteca de cerdo, aceite de soja y aceite de pescado. Para ello, se propone:

- Determinar los cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática en fracciones purificadas obtenidas a partir de órganos procedentes de animales sometidos durante 6 y 18 meses a las intervenciones dietéticas mencionadas.
- Estudiar el efecto de la variación del componente graso de la dieta, en condiciones de restricción calórica, sobre la señalización apoptótica y, en su caso, sobre la tasa de muerte celular, atendiendo a las particularidades de los órganos seleccionados.
- Elaborar una interpretación del efecto de las intervenciones dietéticas sobre las diferentes rutas de señalización apoptótica, analizando su relevancia sobre los potenciales beneficios de dichas intervenciones para la longevidad y los procesos fisiopatológicos vinculados al envejecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y dietas

Para el presente estudio se emplearon ratones C57BL/6, machos y con una edad de tres meses, que se obtuvieron de los laboratorios Charles River (Massachusetts, Estados Unidos). Recibieron cuidados de acuerdo con lo establecido por el documento *Guide for care and use of laboratory animals* (National Research Council, Estados Unidos), la ley *Animal Welfare Act* (PL 89-544, Estados Unidos) y el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, siendo los protocolos aprobados por los comités éticos de experimentación animal de las universidades de California (Davis, Estados Unidos) y Pablo de Olavide (Sevilla).

Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (Universidad Pablo de Olavide), en jaulas individuales para garantizar el control exacto de la ingesta, bajo ciclos de luz y oscuridad de doce horas, a una temperatura de 22°C y con acceso continuo al agua. La ingesta media diaria fue determinada a lo largo de un período de tres semanas en un grupo de treinta ratones, con el fin de establecer un criterio base a partir del cual calcular la cantidad de calorías a suministrar en las diferentes dietas, tanto la denominada *ad libitum* como las que implicaban restricción calórica.

A las diez semanas de edad, los ratones fueron asignados aleatoriamente a uno de los diferentes grupos dietéticos, siendo alimentados con una dieta purificada AIN-93M (*Research Diets*, Nueva Jersey, Estados Unidos). En un procedimiento estándar para evitar la ganancia excesiva de peso y la eventual aparición de obesidad, la dieta *ad libitum* consistió en la alimentación con un 95% de la ingesta diaria previamente establecida. Los animales adscritos a grupos de restricción calórica recibieron diariamente el 60% de dicha cantidad, conteniendo todos los componentes vitamínicos y minerales requeridos para asegurar unos niveles absolutos equivalentes en todos los grupos experimentales.

La única variación entre las dietas que recibieron los distintos grupos fue la fuente lipídica principal, de manera que el grupo *ad libitum* (en adelante, AL) fue alimentado con una dieta cuyo componente graso era el aceite de soja, mientras que se establecieron tres grupos sometidos a restricción calórica (en adelante, grupos RC), alimentados alternativamente con dietas que incorporaban aceite de soja, manteca de cerdo o aceite de pescado, según la

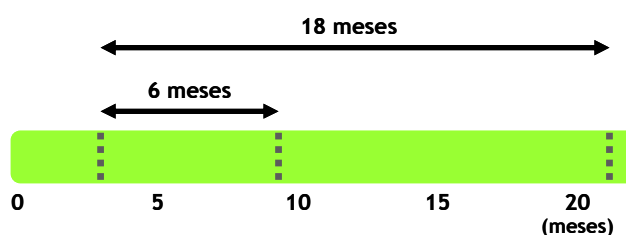


Figura 6. Duración de las intervenciones dietéticas. Los animales sometidos a 6 meses de intervención fueron sacrificados a los 9 meses de edad. Los animales con 18 meses de tratamiento, a los 21 meses.

composición detallada en la **tabla 1**. Adicionalmente, se documentó la composición de ácidos grasos de las distintas fuentes de lípidos que se incorporaron en las dietas, como se muestra en la **tabla 2**.

Para cada una de las intervenciones dietéticas se distinguieron dos grupos de animales, según fueran a ser objeto de 6 o de 18 meses de tratamiento (**figura 6**). Las medidas de ingesta y comprobaciones de salud se llevaron a cabo diariamente en todas las fases del estudio. Todos los animales fueron pesados semanalmente.

Ingredientes	Dieta con manteca de cerdo (g/kg)	Dieta con aceite de soja (g/kg)	Dieta con aceite de pescado (g/ kg)
Caseína	200,00	200,00	200,00
Maicena	397,48	397,48	397,48
Dextrosa	132,00	132,00	132,00
Sacarosa	100,00	100,00	100,00
Celulosa	50,00	50,00	50,00
Aceite de soja	0	70,00	10,00
Manteca de cerdo	70,00	0	0
Aceite de pescado	0	0	60,00
t-butilhidroxiquinona	0,014	0,014	0,014
Mezcla de minerales	35,00	35,00	35,00
Mezcla vitamínica	10,00	10,00	10,00
L-cisteína	3,00	3,00	3,00
Bitartrato de colina	2,50	2,50	2,50

Tabla 1. Composición de las dietas aplicadas a cada grupo de estudio. Aquella cuyo componente graso era aceite de soja se aplicó tanto al grupo *ad libitum* como al grupo *RC-Soja*. Las dietas contenían mezclas de minerales (S10022G) y vitaminas (V10037).

Ácidos grasos	Manteca de cerdo (%)	Aceite de soja (%)	Aceite de pescado (%)
14:0	1.4	0.1	7.5
16:0	23.7	10.2	16.5
16:1(n-7)	0.0	0.1	9.6
18:0	15.0	4.0	3.2
18:1(n-9)	39.2	21.2	8.7
18:1(n-7)	0.0	0.0	2.9
18:2(n-6)	15.2	55.0	1.3
18:3(n-3)	0.5	8.0	0.1
18:4(n-3)	0.1	0.0	3.0
20:4(n-6)	0.2	0.0	0.9
20:5(n-3)	0.0	0.0	17.7
22:6(n-3)	0.0	0.0	10.3
Otros	4.7	1.3	18.4
Total de saturados	40.3	14.8	28.3
Total de n-3	0.7	8.1	33.9
Total de n-6	16.0	55.0	3.2
Ratio n-6/n-3	24.4	6.8	0.1

Tabla 2. Abundancia porcentual de los distintos ácidos grasos en cada una de las fuentes de grasa empleadas en la elaboración de las dietas.

Obtención de las muestras

(Salvo que se indique lo contrario, los reactivos mencionados en adelante fueron adquiridos a Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos)

Los animales fueron sacrificados en las instalaciones del animalario de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla mediante dislocación cervical después de 6 ó 18 meses de tratamiento. Además de los órganos necesarios para otros estudios encuadrados en el mismo proyecto general, se obtuvieron para la presente Tesis el hígado y el músculo esquelético de las extremidades traseras de cada animal, siendo introducidos en tampón de congelación (manitol 0,21 M, sacarosa 0,07 M, DMSO 20%) y sumergidos en nitrógeno líquido, para su posterior conservación a -80° C.

Técnicas de fraccionamiento celular

Aislamiento de membrana plasmática de músculo esquelético

La totalidad del tejido muscular de las extremidades posteriores de cada animal, limpio de grasa y tejido conjuntivo, fue pesado, troceado y a continuación sometido a homogeneización en un sistema de teflón-vidrio durante un minuto, en 2 ml de tampón de homogeneización (Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, KCl 40 mM, sacarosa 0,2 M, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, DTT 1 mM y 40 µg/ml de una mezcla que contenía quimostatina, leupeptina, antipaina y pepstatina A, en adelante, CLAP) por cada gramo de tejido fresco.

Tras un segundo paso de homogeneización mediante un dispersor de cabezal metálico (modelo Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Alemania) durante 30 segundos, el lisado resultante, del que se guardó una muestra denominada homogeneizado total, se sometió a dos centrifugaciones consecutivas a 500 g durante 10 minutos, para eliminar núcleos y células intactas, usando un rotor basculante JS-13.1 en una centrífuga J2-21 (Beckman Coulter Inc, Brea, California, Estados Unidos). El sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado a 100.000 g, usando un rotor basculante SW-60 en una ultracentrífuga L-2 (Beckman Coulter) para separar el citosol de la fracción membranosa cruda.

Dicha fracción membranosa fue cargada en un sistema de partición de doble fase, que contenía un 6% en peso de dextrano T-500 (Amersham, hoy GE Healthcare, Waukesha, Wisconsin, Estados Unidos), 6% en peso de polietilenglicol 3350 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), sacarosa 0,1 M, fosfato potásico 5 mM, pH 7,2, completando con agua destilada hasta un peso total de 16 gramos. Siempre trabajando en

cámara fría y en hielo, el sistema fue invertido 40 veces en un tubo de vidrio de 30 ml y las fases fueron separadas mediante centrifugación a 300 g durante 5 minutos. La fase superior, enriquecida en membrana plasmática, fue recogida y sometida a una nueva partición en una fase inferior limpia. Asimismo, la fase inferior fue mezclada con una fase superior limpia con el fin de optimizar el aislamiento. Esta segunda fase superior fue también lavada con una fase inferior limpia para aumentar la pureza de la muestra. Todas las fases superiores fueron finalmente combinadas para ser diluidas hasta 65 ml con bicarbonato sódico 1 mM y ultracentrifugadas a 100.000 g durante 1 hora en un rotor 45 TI. El *pellet* obtenido se sometió a un nuevo lavado con 65 ml de bicarbonato 1 mM.

Finalmente, las membranas plasmáticas fueron resuspendidas en un volumen de 50 μ l de Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), glicerol 10%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, DTT 0,1 mM y CLAP 40 μ g/ μ l y almacenadas a -80° C.

Aislamiento de membrana plasmática de hígado

Entre 0,5 y 1 gramo de hígado fue homogeneizado en 2 ml de medio de aislamiento por gramo de tejido (Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, manitol 0,225 M, sacarosa 0,075 M, EGTA 0,5 mM, EDTA 10 mM, PMSF 1 mM, DTT 1 mM y CLAP 40 μ g/ml) en un sistema de teflón-vidrio. Se tomó una alícuota que denominamos homogeneizado total y el resto del lisado se diluyó hasta 10 ml, para ser centrifugado por tres veces a 500 g durante 5 minutos en un rotor JS-13.1 (Beckman Coulter), retirando así el material no fraccionado y los núcleos.

A continuación, mediante una centrifugación a 6000 g durante 15 minutos en el mismo rotor se obtuvo una fracción enriquecida en mitocondrias, que se resuspendió en medio de aislamiento y se conservó para otros estudios, mientras que el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 g durante 1 hora en un rotor SW-60 (Beckman Coulter) para separar el citosol de la fracción membranosa. Ésta fue cargada en un sistema de partición de doble fase análogo al del apartado anterior, aunque en este caso con un peso final de 8 g y una concentración de dextrano y polietilenglicol del 6,4%, como se ilustra en la **figura 7**. A partir de este punto continuó el procedimiento tal y como se describe en el apartado anterior.

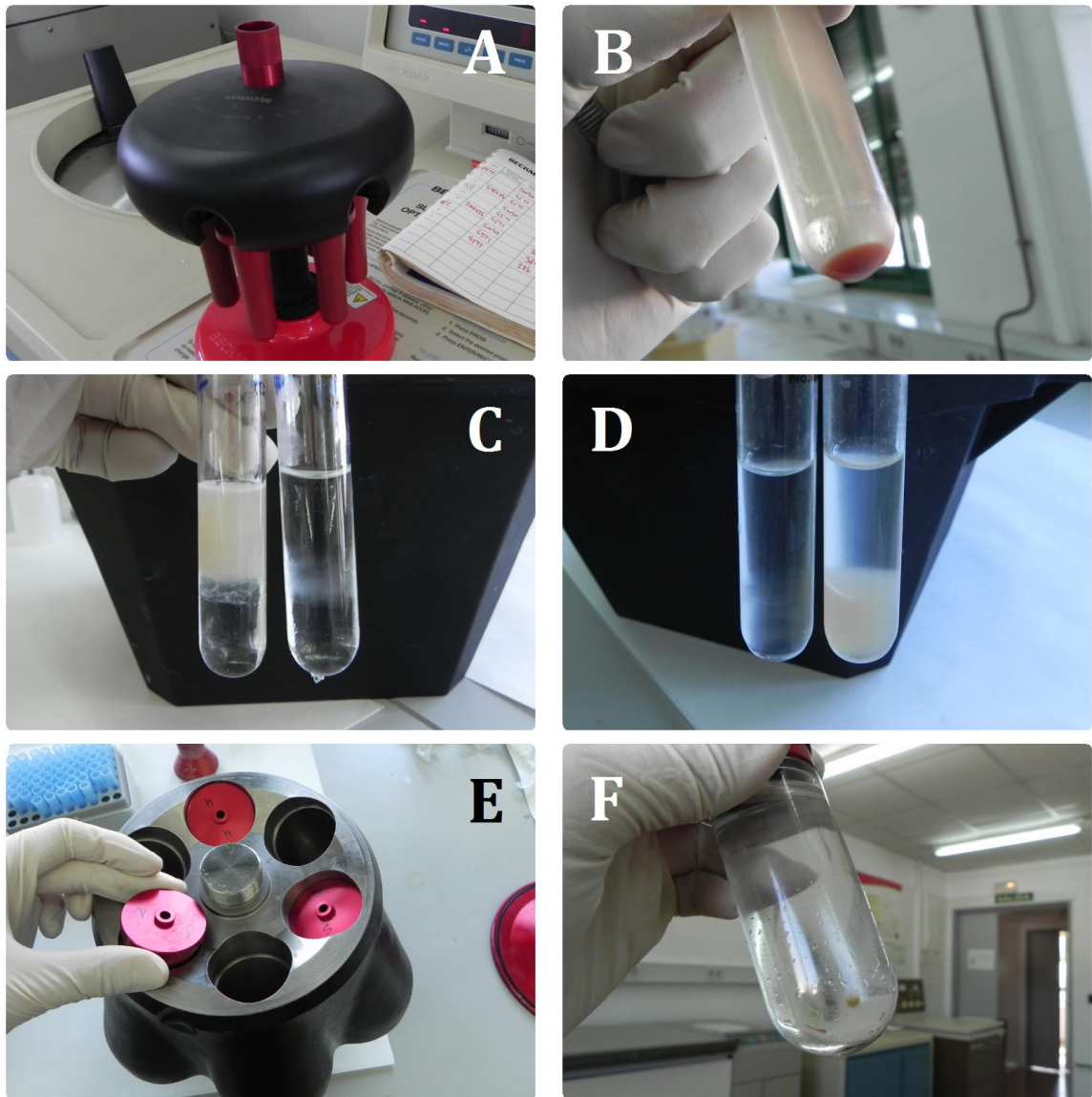


Figura 7. Fotografías ilustrativas del proceso de aislamiento de membrana plasmática de hígado. El extracto, una vez libre de células completas, núcleos y mitocondrias, es sometido a una primera ultracentrifugación (A), separándose el citosol y el *pellet* membranoso (B). Éste es resuspendido y cargado en un sistema de doble fase de 8 g, siempre preparando un sistema adicional sin muestra (C). Tras la agitación y una centrifugación a baja velocidad, se produce la partición de fases (D) y puede procederse a la sustitución de la fase superior usada por la limpia antes. Completado el aislamiento, se llevan a cabo los lavados por ultracentrifugación en bicarbonato 1 mM (E) obteniendo finalmente el *pellet* de la fracción enriquecida en membrana plasmática (F). Para una descripción más detallada consultar el texto.

Determinación de la concentración de proteína en las muestras

Para todas las muestras se empleó el método descrito por Stoscheck (Stoscheck, 1990), derivado del de Bradford (Bradford, 1975). Se tomaron por triplicado alícuotas de hasta 20 μ l de cada muestra, y se mezclaron con 50 μ l de NaOH 1 N, añadiéndose a continuación a cada una 1 ml de reactivo de Bradford (ácido fosfórico 55%, etanol 30%, colorante Blue G 0,67 g/l, de Serva, Heidelberg, Alemania). Tras 10 minutos de incubación en oscuridad, se midió la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro DU-640 (Beckman Coulter).

Para determinar la concentración de proteína se elaboró una recta patrón con cantidades crecientes de γ -globulina (0 a 20 μ g/ μ l), manteniendo la concentración de las soluciones problema dentro del rango lineal del patrón.

Determinación de los niveles de proteínas vinculadas a la apoptosis: Bax, Bcl-2, XIAP, Hsp70, AIF y citocromo c

Preparación de muestras

Las muestras usadas para el estudio de Bcl-2, Bax y XIAP contenían 50 μ g de proteína procedente de homogeneizados totales de músculo o hígado, 7 μ l de una mezcla compuesta, en proporciones 18:1:1, por tampón de carga concentrado (sacarosa 50%, SDS 7,5%, Tris-HCl 0,3 M pH 6,8, DTT 0,1 M, EDTA 10 mM y azul bromofenol 0,5 mg/ml), CLAP (5 mg/ml) y PMSF (100 mM) y agua hasta el volumen permitido por el pocillo. Las muestras fueron calentadas a 45°C durante 15 minutos y centrifugadas brevemente antes de su utilización.

En el caso de los estudios de AIF, Hsp70 y citocromo c, se emplearon 50 μ g de proteína citósolica de músculo o hígado, mezclados de forma idéntica a lo descrito y sometidos a un calentamiento a 100°C durante 5 minutos, así como a una breve centrifugación.

Electroforesis

Se emplearon geles *TGX* (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) con una concentración de poli(acrilamida) distribuida en un gradiente del 4% al 20% y un grosor de 1 mm. Para el estudio del efecto de la restricción calórica frente a una dieta *ad libitum* con aceite de soja, en animales jóvenes y viejos, se usaron geles de 18 pocillos. Las comparaciones

entre las distintas fuentes de grasa requirieron geles de 26 pocillos. Una de las carreras se reservó en todo caso para 5 μ l de marcador de peso molecular (*Dual color Precision Plus Protein standards*, Bio-Rad) que se usó mezclado con 20 μ l de tampón de carga, diluido cinco veces con respecto a las concentraciones antes citadas.

Las proteínas se separaron en un sistema *Criterion* (Bio-Rad) aplicando un voltaje constante de 200 V (I_{\max} de 150 mA) durante un tiempo aproximado de 40 minutos.

Transferencia y control de carga

Una vez completada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Biotrace NT, Pall Corporation, Nueva York, Estados Unidos) incluida en el kit *Trans-blot Turbo* (Bio-Rad), utilizado con el sistema de transferencia del mismo nombre con un programa rápido de 25 V (I_{\max} de 2,5A) durante 7 minutos.

A continuación, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con colorante rojo Ponceau S diluido al 0,1% en ácido acético al 1%, durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. El exceso de colorante se eliminó con lavados sucesivos con ácido acético al 1%. El patrón de bandas producido por la tinción fue digitalizado en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad).

La membrana fue entonces sometida a dos pasos de bloqueo con una duración mínima de 30 minutos cada uno, en agitación y a temperatura ambiente, en un tampón TTBSL (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 0,85%, Tween 20 0,05% y leche en polvo desnatada 5%).

Inmunotinción y revelado

La inmunodetección de las correspondientes proteínas se llevó a cabo mediante una incubación durante 16 horas, en agitación y a 4°C, en una solución de anticuerpo primario diluida en TTBSL a la concentración que se indica en la **tabla 3** para cada caso.

Concluida dicha incubación, la membrana fue lavada tres veces, a temperatura ambiente y en agitación durante 5 minutos, con una solución TTBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 0,85%, Tween 20 0,05%). A continuación, se añadió un anticuerpo secundario capaz de detectar al primario, y acoplado la enzima peroxidasa, diluido en TTBSL según las correspondencias y concentraciones señaladas en la **tabla 3**. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se retiró el anticuerpo secundario en TTBSL y se llevaron a cabo tres nuevos lavados a temperatura ambiente con TTBS, de 5 minutos cada uno. Por último, se lavó

durante 15 minutos con un tampón TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 0,85%) antes de proceder al revelado mediante quimioluminiscencia siguiendo las especificaciones técnicas del kit *Rodeo ECL* (USB, Cleveland, Ohio, Estados Unidos) y empleando películas Kodak *Biomax XAR* (Carestream Health, Rochester, Nueva York, Estados Unidos).

Anticuerpo primario	Dilución	Referencia	Anticuerpo secundario	Dilución	Referencia
Anti-Bax	1:400	SC-7480	Anti-IgG de ratón	1:2000	Sigma A-9044
Anti-Cit <i>c</i>	1:100	Ph 65981A	Anti-IgG de ratón	1:2000	Sigma A-9044
Anti-Bcl-2	1:400	SC-492	Anti-IgG de conejo	1:3000	SC-2004
Anti-Xiap	1:200	SC-8789	Anti-IgG de cabra	1:3000	Sigma A-5420
Anti-AIF	1:400	SC-9416	Anti-IgG de cabra	1:3000	Sigma A-5420

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección de proteínas vinculadas a las rutas de señalización de la apoptosis. Cada anticuerpo primario fue utilizado en combinación con el anticuerpo secundario descrito a su derecha. Los códigos que comienzan por SC pertenecen a la casa comercial Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, California, Estados Unidos). El anticuerpo anti-citocromo *c* procede de Pharmingen, actualmente BD Biosciences (San José, California, Estados Unidos). Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón y anti-IgG de cabra se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Cuantificación

Tras la digitalización con el densitómetro GS-800 (Bio-Rad), las bandas de interés fueron cuantificadas con el programa *Quantity One* (Bio-Rad). Las densidades ópticas registradas se normalizaron con el control de carga proteica para cada calle, proporcionado por la tinción con rojo Ponceau S.

Análisis de la pureza de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática

Se prepararon muestras que contenían 50 µg de proteína procedente de homogeneizados totales, y otras con 10 µg de proteína de fracciones enriquecidas en membrana plasmática. A dicho material se añadieron 7 µl de una mezcla compuesta, en proporciones 18:1:1, por tampón de carga concentrado (sacarosa 50%, SDS 7,5%, Tris-HCl 0,3 M pH 6,8, DTT 0,1 M, EDTA 10 mM y azul bromofenol 0,5 mg/ml), CLAP (5 mg/ml) y PMSF (100 mM) y agua hasta 35 µl. Las muestras fueron calentadas a 45°C durante 15 minutos y centrifugadas brevemente antes de su utilización.

La separación se realizó en geles de poliacrilamida a una concentración del 10%, de 1,5 mm de espesor, preparados mediante una mezcla 5 ml de tampón de separación 2X (Tris-HCl 0,77 M pH 8,8, SDS 7 mM), 2,5 ml de acrilamida/bisacrilamida 29:1 al 40%, 2,45 ml de

agua, 50 µl de persulfato amónico al 10% y 10 µl de TEMED. Sobre dicho gel se polimerizó un gel de apilamiento o *stacking*, 4% de poliacrilamida, preparado a partir de 2,5 ml de tampón *stacking* 2X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS 7 mM), 0,5 ml de acrilamida/bisacrilamida 29:1 al 40%, 1,97 ml de agua, 25 µl de persulfato amónico al 10% y 5 µl de TEMED.

Se empleó el sistema de electroforesis *Mini-Protean 3* (Bio-Rad) con un tampón de electroforesis o *running buffer* compuesto por glicina 192 mM, Tris 25 mM y SDS 3,5 mM. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa se llevó a cabo con un sistema *Trans-Blot SD Transfer Cell* (Bio-Rad), a un voltaje constante de 25 V (I_{\max} 0,25 A) durante 45 minutos en un tampón semiseco (metanol 20%, glicina 0,2 M, Tris 50 mM, SDS 1 mM) y previa incubación del gel durante 15 minutos a temperatura ambiente en ese mismo tampón.

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas fueron teñidas con rojo Ponceau S tal y como se describe en el apartado anterior, continuando el proceso de forma idéntica hasta el revelado, con la excepción de la inmunodetección de la Na⁺/K⁺ ATPasa (**tabla 4**). En este caso, tras la incubación con anticuerpo secundario y los lavados sucesivos con TTBS, se llevaron a cabo dos incubaciones a temperatura ambiente durante 5 minutos con tampón para la actividad fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M a pH 9, NaCl 0,1 M y Cl₂Mg 5 mM). El revelado se realizó en oscuridad, añadiendo por cada mililitro de tampón 6,6 ml de azul de nitrotetrazolio (NBT) al 5% y 3,3 ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) al 5%. Tras una breve incubación, el producto obtenido permitió la cuantificación del polipéptido en la membrana.

Anticuerpo primario	Dilución	Ref.	Anticuerpo secundario	Dilución	Ref.
Anti-Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	1:500	SC-21712	Anti-IgG de ratón	1:3000	Sigma A-3562
Anti-actina	1:400	Sigma A-2066	Anti-IgG de conejo	1:3000	SC-2004
Anti-cit c oxid.	1:400	N/A	Anti-IgG de ratón	1:2000	Sigma A-9044

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en la determinación de la pureza de las fracciones enriquecidas en membrana plasmática. Cada anticuerpo primario fue utilizado en combinación con el anticuerpo secundario descrito a su derecha. Los códigos que comienzan por SC pertenecen a Santa Cruz Biotechnologies.

Ensayo de la actividad esfingomielinasa neutra

La actividad esfingomielinasa neutra dependiente de Mg^{2+} fue medida en muestras de membrana plasmática de músculo esquelético e hígado, siguiendo el método descrito por Martin *et al.* [250].

En un tubo de vidrio se mezclaron y secaron 10 nmol de esfingomielina y 5 nmol de metil- ^{14}C -esfingomielina (Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, Estados Unidos) por cada ensayo a realizar, siendo resuspendidos en un volumen de 100 μ l de medio de ensayo por cada muestra (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, tritón X-100 0,05%, DTT 5 mM y $MgCl_2$ 10 mM).

La actividad se midió por triplicado frente a un control de proteína hervida (5 minutos), usando 10 μ g por ensayo, con una incubación de 30 minutos a 37°C en agitación. La reacción se detuvo por la adición de 900 μ l de una mezcla de cloroformo-metanol en proporción 2:1, así como de 200 μ l de agua destilada.

Tras agitación y centrifugación (1500 g, 5 minutos) de los tubos, se tomaron 400 μ l de la fase acuosa superior y se añadieron a 3 ml de líquido de centelleo (Biogreen 1, Scharlau, Barcelona, España). Las lecturas se tomaron en un contador de centelleo LS600TA (Beckman Coulter) usando un programa de detección de ^{14}C durante 5 minutos. La actividad específica se expresó en CPM x min^{-1} x mg^{-1} .

Ensayo de actividad de las caspasas -8, -9 y -3

La actividad de las diferentes caspasas estudiadas se midió en fracciones citosólicas de músculo esquelético e hígado. La actividad proteolítica de las mismas se determinó mediante fluorimetría en un medio de ensayo compuesto por un tampón HEPES-KOH 25 mM (pH 7,4), sacarosa 10%, NP-40 1%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y DTT 5 mM, añadiéndose 200 μ g de proteína citosólica en un volumen total de 200 μ l.

Las muestras fueron preincubadas a 37°C durante 25 minutos en medio de ensayo y a continuación se añadieron los sustratos a una concentración final de 40 μ M. Dichos sustratos fueron Ac-IETD-AMC, Ac-LEHD-AMC y Ac-DMQD-AMC para las caspasas 8/10, 9 y 3, respectivamente (Alexis Corporation, San Diego, California, Estados Unidos). Posteriormente se llevó a cabo una incubación de 1 hora a 37°C en oscuridad, y la reacción se detuvo con 20 μ l de HCl 1 N.

Las muestras fueron diluidas con 1,5 ml de agua destilada y se midió la señal fluorescente con un espectrómetro de luminescencia Aminco-Bowman Series 2, con longitud de onda de excitación de 380 nm, y de emisión de 460 nm.

Los ensayos se efectuaron en presencia y en ausencia de un inhibidor específico de cada caspasa: Ac-IETD-CHO, Ac-LEHD-CHO y Ac-DMQD-CHO para las caspasas 8/10, 9 y 3, respectivamente (Alexis Corporation, San Diego, California, Estados Unidos). El inhibidor se añadió durante la preincubación a una concentración final de 83 μ M. La actividad caspasa se calculó a partir de la diferencia entre las medidas de fluorescencia en presencia y en ausencia del correspondiente inhibidor. Las actividades fueron expresadas en unidades arbitrarias/mg de proteína.

Extracción de compuestos quinónicos

Siguiendo en líneas generales el protocolo descrito por Menke [328], 30 μ g de proteína de membrana plasmática purificada procedente de muestras de músculo esquelético e hígado fue mezclada con solución de Hank (Sigma) hasta un volumen de 90 μ l, añadiéndose 10 μ l de SDS 10% y agitando vigorosamente (vórtex) durante un minuto. A continuación se añadieron 200 μ l de una mezcla de etanol e isopropanol en proporción 95:5, se repitió la agitación, y se completó la extracción con 500 ml de hexano (pureza para HPLC, Merck) y otro paso de vórtex.

Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf). 400 μ l de la fase superior, de hexano, fueron llevados a un tubo limpio y sustituidos por 400 μ l de hexano puro, repitiendo el paso de agitación y centrifugación para obtener una nueva fase superior. Los 800 μ l de hexano con los compuestos quinónicos fueron secados en una centrífuga evaporadora o *speed-vac* Univapo 150H (Uniequip GmbH, Planegg, Alemania) y las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Cuantificación de coenzima Q en HPLC

El residuo lipídico seco fue resuspendido en un volumen de 30 μ l de etanol (pureza para HPLC de Panreac, Barcelona, España), inyectándose 20 μ l con una jeringa Hamilton para su separación en una columna C18 de fase reversa (25 x 0,45 cm, 5 μ m de tamaño de partícula, Beckman Coulter), a un flujo de 1 ml/min.

La composición de la fase móvil consistió en una mezcla de metanol, n-propanol y acetato amónico 1 M (pH 4,4, proporción 53:45:2). La monitorización se llevó a cabo con un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Chelmsford, Massachussets, Estados Unidos) equipado con una célula analítica Model 5010, con potenciales de -500 mV y +300 mV.

Las quinonas fueron detectadas por el segundo electrodo, cuantificándose mediante integración de las áreas de las señales de los estados reducido y oxidado de CoQ₉ y CoQ₁₀. Dichas señales se compararon con una recta patrón elaborada a partir de cantidades conocidas de estándares externos de CoQ₉ y CoQ₁₀.

Extracción de lípidos de membrana plasmática

Mediante el protocolo de Bligh y Dyer se llevó a cabo la extracción de los lípidos de la membrana plasmática empleando un volumen de muestra que contuviera 30 µg de proteína.

A dicho volumen se le añadieron 550 µl de solución de Hank, 660 µl de metanol con ácido acético al 2% y 660 µl de cloroformo, agitando vigorosamente en cada paso. Tras una centrifugación a 10.000 g se recogió la fase inferior (cloroformo) con una jeringa Hamilton, y se depositó en un tubo de cristal para su secado y conservación a -80°C en atmósfera de nitrógeno.

Análisis de los ácidos grasos de la membrana plasmática

Los extractos lipídicos secos por el método de Bligh y Dyer fueron enviados para su análisis a *Lipid Technologies LLC* (Austin, Minnesota, Estados Unidos), obteniendo una descripción detallada de la composición de ácidos grasos de la membrana plasmática de las muestras correspondientes a todas las dietas y edades para los dos órganos estudiados.

Para su identificación, los lípidos fueron metilados con trifluoruro de boro (10%) en presencia de metanol, en un baño a 80°C durante 90 minutos. Los ésteres resultantes de metilo y ácidos grasos fueron extraídos con éter de petróleo y agua y mantenidos congelados para su separación y cuantificación mediante un análisis por cromatografía de gases capilar. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de cada ácido graso individual sobre el total.

Determinación del índice apoptótico mediante ELISA

El índice apoptótico total en los tejidos estudiados se determinó empleando el kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Dicho kit se basa en un sistema colorimétrico de detección de los nucleosomas procedentes de la degradación del material nuclear en el proceso de muerte celular programada. Un anticuerpo anti-histona conjugado con biotina se fija a la estreptavidina adherida a la placa. Paralelamente, otro anticuerpo anti-ADN conjugado con una actividad peroxidasa se une al material genético fraccionado.

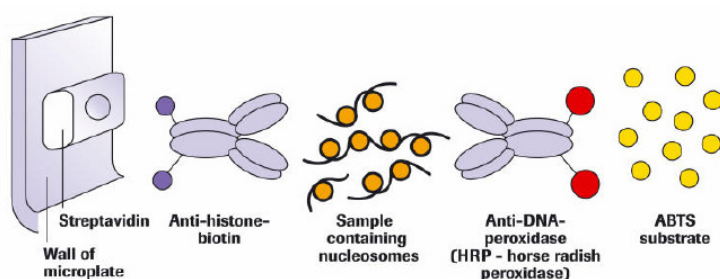


Figura 8. Principio de actuación de los reactivos incluidos en el kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}*. Dos anticuerpos detectan los distintos componentes de los nucleosomas y se unen, respectivamente, a la placa y al reactivo generador de la señal (imagen de Roche Diagnostics).

Son necesarios 10 µg de proteína citosólica de hígado o 100 µg de proteína citosólica de músculo esquelético en cada pocillo, diluidos hasta 20 µl con medio de ensayo. Una mezcla de 80 µl, en proporción 18:1:1, del medio de reacción y cada uno de los anticuerpos resuspendidos, se añade al pocillo.

Completadas las 2 horas de incubación, se llevan a cabo sucesivos lavados con medio de reacción para garantizar que se retira todo el material no adherido a la estreptavidina de la superficie del pocillo y se incuba la placa durante 15 minutos con solución de revelado. La reacción es detenida y la absorbancia resultante de cada muestra se mide a 405 nm, añadiendo controles positivos y negativos.

Análisis estadístico y representación

Para el tratamiento matemático de los datos se empleó el programa *Microsoft Excel*. Para la generación de los gráficos de los resultados, así como para el análisis estadístico de los mismos, se empleó el programa *GraphPad Prism5*.

Las comparaciones simples entre grupos de animales jóvenes y viejos pertenecientes a la misma dieta, para estudiar exclusivamente el efecto del envejecimiento, así como las

comparaciones destinadas a conocer el efecto de la restricción calórica *per se* entre los grupos *ad libitum* y RC-Soja, se llevaron a cabo mediante pruebas *t* de Student. En los casos en que la diferencia entre las varianzas así lo impusiera, se practicó el test de Welch. La prueba *U* de Mann-Whitney se usó para las comparaciones en que uno de los grupos presentara idénticos valores en todas sus repeticiones. En el apartado Resultados, los cambios significativos debidos a la edad se indicarán con un asterisco (*) si se obtiene una $p < 0,05$, dos para $p < 0,01$ y tres asteriscos para $p < 0,001$. Los cambios debidos a la restricción calórica se indicarán con las letras “cr” sobre la barra correspondiente a la dieta *ad libitum*.

Para comparar entre sí los datos procedentes de los tres grupos con tratamientos de restricción calórica se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, aplicando el test de comparaciones múltiples de Tukey para buscar diferencias entre los grupos. Las diferencias significativas en este caso se indicarán con las letras “l”, “s”, o “f” sobre la columna cuya media sea significativamente diferente a la de la dieta con manteca de cerdo (*lard*, l), soja (s) y pescado (*fish*, f), respectivamente.

Se comprobó asimismo la posible existencia de una tendencia lineal en los datos al ordenar las dietas en función del ratio de ácidos grasos n-6/n-3. Cuando dicha tendencia fue significativa (ANOVA de una vía con post test *linear trend*) se representó en las gráficas con el símbolo “#” en el grupo de edad para el que existe linealidad.

Por último, el efecto combinado de la edad y el tipo de dieta se estudió mediante el ANOVA de dos vías.

RESULTADOS

Peso de los ratones tras las diferentes intervenciones dietéticas

Las diferentes intervenciones dietéticas aplicadas sobre los animales durante 6 y 18 meses en las instalaciones de la Universidad Pablo de Olavide produjeron los efectos que se muestran en la figura XX. Aunque en la gráfica sólo se muestran las diferencias significativas frente a una dieta CR-Soy, la restricción calórica reduce el peso de los animales en todos los casos y en ambas edades. Entre las dietas basadas en aceite de soja, la restricción calórica reduce el peso de los animales jóvenes en un 30%, y el de los animales viejos en un 15%.

No se observan diferencias en el peso como consecuencia de los diferentes tipos de grasa predominantes en la dieta. Se percibe una tendencia al incremento del peso en los ratones con restricción calórica a los 18 meses de tratamiento, que es significativa en el caso de los grupos CR-Lard (+6%) y CR-Soy (+13,7%).

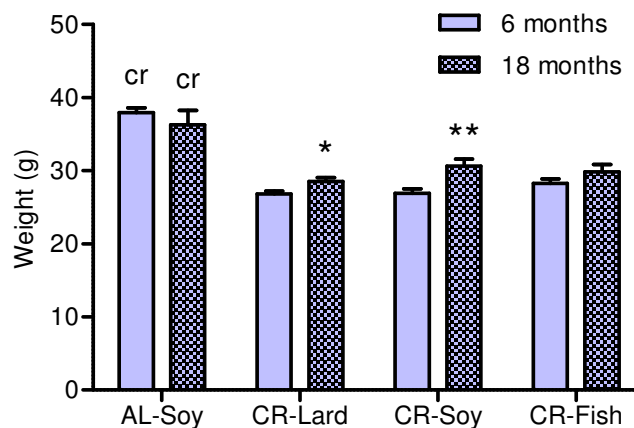


Figura 9. Peso de los ratones C57BL/6 tras las diferentes intervenciones dietéticas durante 6 y 18 meses. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 6 y 20 animales (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr" $p < 0,05$ frente a la dieta CR-Soy de la misma edad).

Efectos de las intervenciones dietéticas y el envejecimiento sobre el músculo esquelético

Obtención de fracciones enriquecidas en sarcolema

Empleando la metodología descrita, obtuvimos fracciones enriquecidas en membrana plasmática de fibras musculares con las que se llevó a cabo una caracterización funcional y estructural de la misma. Las fracciones de membrana plasmática mostraron un contenido 17 veces superior al homogeneizado total para el marcador Na^+/K^+ ATPasa (**figura 10**).

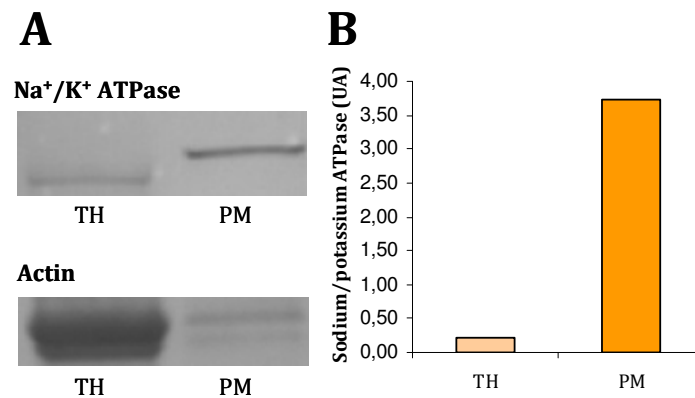


Figura 10. Fracciones enriquecidas en sarcolema. Se muestra la inmunodetección (A) de un marcador de membrana plasmática, la Na^+/K^+ ATPasa, y de la actina en muestras de homogeneizado total (TH) y fracciones enriquecidas en sarcolema (PM). La normalización con la carga de proteína muestra un enriquecimiento (B) en el contenido de membrana plasmática.

Composición de la membrana plasmática: análisis de ácidos grasos

En primer lugar, con el objetivo de tener una prueba de la medida en que la composición de las dietas tiene su reflejo en la composición de la membrana plasmática o sarcolema, se procedió a analizar el perfil de los ácidos grasos contenidos en los lípidos de dicha membrana. El análisis detalla la composición de treinta y cinco ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, distinguiendo entre las series n-3, n-6 y n-9, y sus resultados se muestran en las **tablas 6 y 7**. Los siguientes ácidos grasos no se muestran en las tablas al no haber sido detectados en ninguna de las muestras enviadas para análisis: 16:1 n-9, 18:1 n-7, 18:1 n-5, 20:3 n-3 y 20:4 n-3.

Los resultados obtenidos muestran que en la membrana plasmática existe una predominancia de los ácidos grasos saturados (SFA) 16:0 y 18:0, que junto al resto de SFA suponen en torno al 95% del total en los animales jóvenes (6 meses de intervención dietética, **tabla 6**) y un 96-97% del total en los animales viejos (**tabla 7**). Esta notoria y casi completa

depleción de los ácidos grasos insaturados en el sarcolema, repetida en todas las muestras enviadas (n=4 para cada dieta y edad), fue comprobada mediante un segundo análisis en otro laboratorio de referencia con experiencia en perfiles lipídicos (en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación, Universidad de Córdoba). Aunque este segundo análisis no tiene capacidad para determinar la concentración de numerosos ácidos grasos minoritarios de las series n-6 y n-3, confirmó la predominancia de los SFA. La elección de este segundo laboratorio se llevó a cabo con el fin de evitar tiempos prolongados de almacenamiento de la muestra y cambios de temperatura frecuentemente asociados al transporte. La comparación de ambos análisis se muestra en la **tabla 5**. El ácido graso más abundante es el esteárico, 18:0, que supone un 62-63% del total, seguido del ácido palmítico, 16:0, con un 27-28% en los animales jóvenes y un 29-30% en los viejos. No se aprecian diferencias significativas entre las distintas dietas con respecto a la presencia de estos ácidos grasos.

La restricción calórica provoca, en los animales jóvenes, un descenso del 20% en la proporción de ácidos grasos altamente insaturados (HUFA, con tres o más dobles enlaces en su cadena) frente a la dieta AL-Soy. Este descenso se debe a la bajada en los niveles del ácido graso 22:5 n-3 y del ácido docosahexaenoico (DHA/22:6 n-3). Dicho efecto se pierde, sin embargo, en los animales viejos, donde sólo se observan cambios menores debidos a la CR en el SFA 14:0 y en el 16:1 n-7.

	14:0	16:0	16:1 n-7	17:0	18:0	18:1 n-9	18:3 n-3	20:0	22:0
LipidLab	1,19	30,72	0,32	0	65,43	0,54	0	1,59	0,22
UCO/SCAI	1,56	33,69	0,59	0,6	58,31	2,47	1,32	1,3	0,17

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos en una misma muestra según los datos proporcionados por los dos laboratorios de análisis lipídicos consultados. Comparación de los resultados obtenidos en el análisis llevado a cabo por la empresa LipidLab (MN, Estados Unidos) con el perfil obtenido para la misma muestra en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (UCO). Los datos han sido normalizados en función de los ácidos grasos detectables por este segundo laboratorio.

Las diferentes dietas de restricción calórica en las que se ha alterado el componente graso muestran una notable influencia sobre la fracción insaturada de los ácidos grasos del sarcolema. De manera general, la cantidad total de monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) permanece invariable en las diferentes dietas, dentro de cada grupo de edad (**figuras 11 y 12**). Dentro de los MUFA, ningún ácido graso presenta diferencias significativas entre dietas. Sin embargo, la proporción de los distintos PUFA se ve sustancialmente alterada: la ratio entre el conjunto de la serie n-6 y la serie n-3 desciende desde 2,2 en la dieta de restricción calórica que incorpora manteca de cerdo (en adelante, *CR-Lard*) hasta 0,9 en la que se basa en aceite de pescado (*CR-Fish*), en animales jóvenes. En animales viejos el efecto es mayor, entre 10,4 en el grupo *CR-Lard* y 0,6 en el *CR-Fish*. Los valores de los animales pertenecientes al grupo de restricción calórica con aceite de soja (*CR-Soy*) son intermedios en ambas edades.

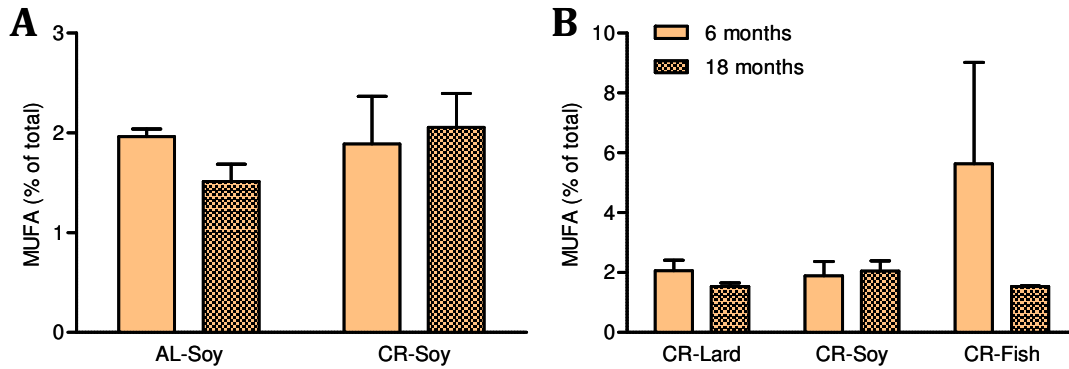


Figura 11. Total de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en el sarcolema. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales.

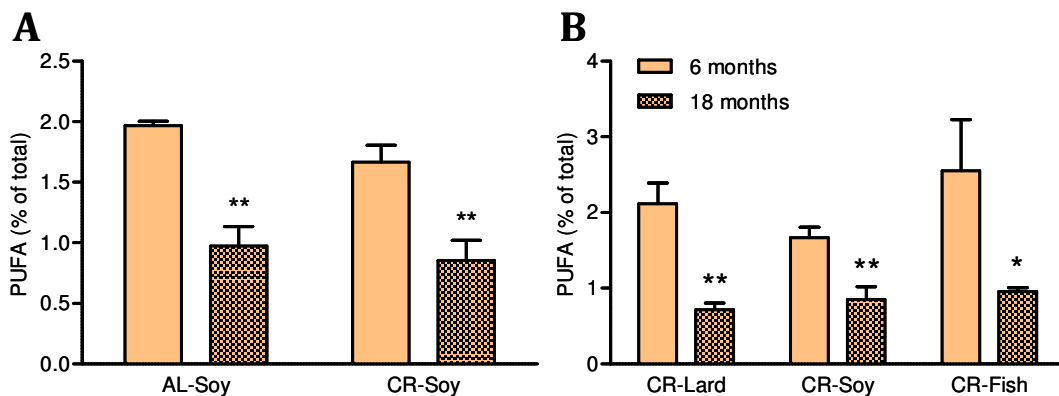


Figura 12. Total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en el sarcolema. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento).

El envejecimiento no produce cambios significativos en la proporción de MUFA ni de ácidos grasos saturados. No obstante, dado que estos últimos suponen la mayor parte del total, el ligero aumento de los mismos (debido principalmente al ácido palmítico) en los animales viejos es el principal responsable de un descenso significativo en la proporción de PUFA en todas las dietas.

Los ácidos grasos de la serie n-6 más abundantes en el sarcoplasma son el ácido linoleico (LA/18:2 n-6), precursor de la serie, y el araquidónico (AA/20:4 n-6), el más importante de ellos en relación a los procesos de señalización inflamatoria. Como se muestra en la **figura 13**, el AA varía de la misma forma que la ratio n-6/n-3 entre dietas, siendo más abundante en el grupo *CR-Lard*. En los animales de mayor edad se registra en todas las dietas un descenso uniforme en la abundancia de AA en el sarcolema, de entre el 70% y el 80% para todos los grupos, manteniendo la mencionada tendencia entre las distintas fuentes de grasa. El LA, por su parte, desciende con el envejecimiento en todos los grupos de una manera uniforme.

Por lo que respecta a la serie n-3 (**figura 14**), los animales alimentados con aceite de pescado como componente graso presentan en ambos grupos de edad los mayores niveles proporcionales, siendo el más abundante el DHA. La tendencia generalizada para los ácidos grasos individuales (DHA, EPA, 22:5 n-3) entre las distintas dietas es, por tanto, inversa a la mostrada por los ácidos grasos n-6, e inversamente proporcional al ratio n-6/n-3. El contenido total en ácidos grasos de la serie n-3 disminuye en todas las dietas con el envejecimiento (en *CR-Soy*, $p = 0,056$), especialmente en la dieta *CR-Lard*, en la que los animales viejos presentan tan sólo un 0,08% de ácidos grasos n-3 en el sarcolema. Es remarcable, asimismo, la ausencia del precursor de la serie, el ácido linolénico (LNA/18:3 n-3) en los animales viejos de todas las dietas, incluidos los del grupo *CR-Fish*. En los animales jóvenes, la suma de los ácidos grasos n-3 más activos biológicamente, el EPA y el DHA, supone un 1,01% del total en los animales alimentados con aceite de pescado, aproximadamente el doble que en las dietas con aceite de soja (0,49%) y con manteca de cerdo (0,43%).

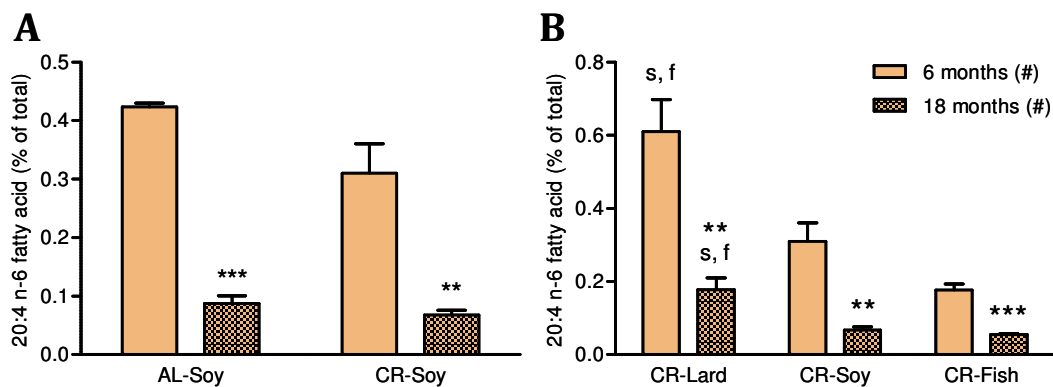


Figura 13. Presencia de ácido araquidónico (20:4 n-6) en el sarcolema. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "l,s", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Lard* y *CR-Soy* para esa misma edad).

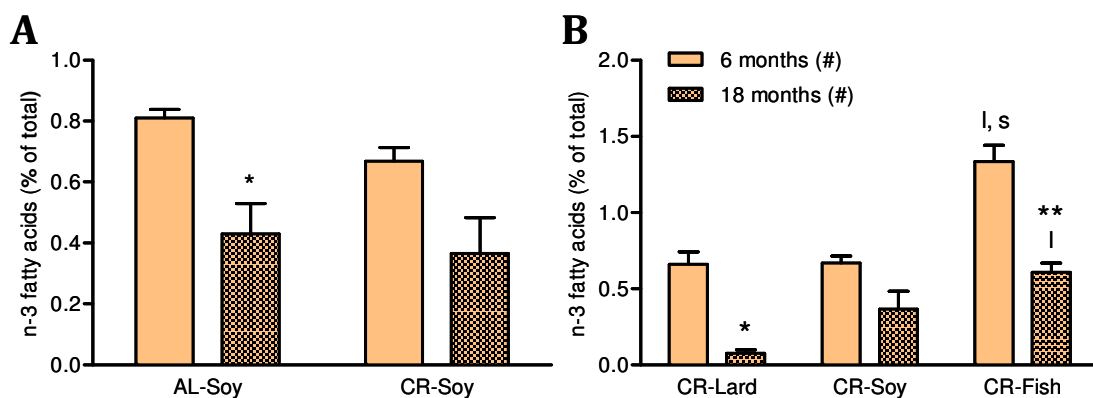


Figura 14. Total de ácidos grasos de la serie n-3 en el sarcolema. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "l,s", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Lard* y *CR-Soy* para esa misma edad).

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
12:0	0,11 ± 0,20	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,04	0,08 ± 0,03
14:0	1,05 ± 0,04	1,18 ± 0,20	1,12 ± 0,14	1,18 ± 0,14
14:1	0,08 ± 0,07	0,16 ± 0,14	0,04 ± 0,05	0,21 ± 0,08
15:0	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,10	0,19 ± 0,16	0,21 ± 0,03
15:1	0,04 ± 0,07	0,09 ± 0,06	0,09 ± 0,12	0,12 ± 0,02
16:0	28,10 ± 0,17	28,76 ± 1,69	28,53 ± 0,39	27,38 ± 1,42
16:1 n-7	0,23 ± 0,04	0,26 ± 0,13	0,28 ± 0,18	0,36 ± 0,12
17:1	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,06	0,16 ± 0,15	0,11 ± 0,03
18:0	64,03 ± 0,39	62,81 ± 2,88	63,51 ± 0,74	58,83 ± 5,66
18:1 n-9	1,18 ± 0,11	1,16 ± 0,34	0,90 ± 0,59	2,20 ± 2,17
18:2 n-6 (LA)	0,37 ± 0,05	0,36 ± 0,08	0,38 ± 0,09	0,67 ± 0,84
18:3 n-6	0,15 ± 0,00	0,02 ± 0,05	0,16 ± 0,02	0,20 ± 0,19 #
18:3 n-3 (LNA)	0,01 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,01 a,c	0,14 ± 0,01
18:4 n-3	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,04
20:0	1,68 ± 0,02	1,62 ± 0,23	1,71 ± 0,05	1,54 ± 0,10
20:1 n-7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:1 n-9	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,06	0,16 ± 0,07	2,11 ± 3,10
20:2 n-6	0,04 ± 0,04	0,10 ± 0,03	0,06 ± 0,09	0,06 ± 0,05
20:3 n-9	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:3 n-6	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,02 #
20:4 n-6 (AA)	0,42 ± 0,01	0,61 ± 0,18 b,c	0,31 ± 0,10	0,18 ± 0,03 #
20:5 n-3 (EPA)	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,04	0,11 ± 0,01 a,b #
22:0	0,19 ± 0,13	0,17 ± 0,11	0,19 ± 0,20	0,47 ± 0,40
22:1 n-9	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,06	0,16 ± 0,11
22:4 n-6	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,03 ± 0,04	0,08 ± 0,14
22:5 n-6	0,02 ± 0,02	0,17 ± 0,06 b,c	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 #
22:5 n-3	0,15 ± 0,00 *	0,01 ± 0,03 c	0,10 ± 0,07	0,14 ± 0,06 #
22:6 n-3 (DHA)	0,60 ± 0,07 *	0,42 ± 0,16	0,47 ± 0,08	0,90 ± 0,13 a,b #
24:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00
24:1	0,09 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,15 ± 0,11	0,37 ± 0,47
Otros	0,72 ± 0,26	1,08 ± 0,30	1,17 ± 0,51	2,11 ± 0,60 a #

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
Saturados	95,35 ± 0,45	94,75 ± 1,31	95,28 ± 0,84	89,70 ± 6,96
MUFA	1,96 ± 0,14	2,06 ± 0,70	1,89 ± 0,96	5,64 ± 5,87
PUFA	1,97 ± 0,06	2,12 ± 0,55	1,67 ± 0,28	2,55 ± 1,17
HUFA	1,55 ± 0,06 *	1,66 ± 0,45	1,23 ± 0,19	1,82 ± 0,39
Total de n-3	0,81 ± 0,05	0,66 ± 0,16	0,67 ± 0,09	1,33 ± 0,18 a,b #
Total de n-6	1,15 ± 0,04	1,46 ± 0,42	1,00 ± 0,24	1,22 ± 1,19
Total de n-9	1,60 ± 0,16	1,63 ± 0,54	1,35 ± 0,73	5,05 ± 5,80
Ratio n-6/n-3	1,42 ± 0,11	2,21 ± 0,43	1,50 ± 0,37	0,94 ± 0,95 #
n-3: % de HUFA	52,22 ± 1,31	40,40 ± 5,62	54,52 ± 5,60	74,69 ± 12,76 a,b #

Tabla 6. Perfil de ácidos grasos en el sarcolema de tejido muscular esquelético de ratones tras 6 meses de intervención dietética. Los resultados son la media ±SD de 4 animales, y se expresan como porcentaje sobre el total de ácidos grasos, a excepción de la ratio n-6/n-3 y el porcentaje de n-3 del total de HUFA (* p < 0,05 frente a la dieta *CR-Soy*; # p < 0,05 para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "a, b, c" p < 0,05 frente a las dietas *CR-Lard*, *CR-Soy* y *CR-Fish*, respectivamente).

Resultados

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
12:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14:0	1,21 ± 0,06 *	1,16 ± 0,07	1,31 ± 0,05 ^a	1,20 ± 0,05
14:1	0,07 ± 0,05	0,04 ± 0,03	0,09 ± 0,06	0,04 ± 0,04
15:0	0,19 ± 0,08	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02
15:1	0,06 ± 0,08	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
16:0	29,88 ± 0,38	29,82 ± 0,65	30,02 ± 0,69	30,45 ± 1,19
16:1 n-7	0,35 ± 0,04 *	0,38 ± 0,07	0,43 ± 0,04	0,39 ± 0,03
17:1	0,07 ± 0,06	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01
18:0	63,38 ± 1,19	63,57 ± 0,67	62,78 ± 1,28	62,95 ± 1,48
18:1 n-9	0,75 ± 0,12	0,85 ± 0,12	1,09 ± 0,51	0,81 ± 0,08
18:2 n-6 (LA)	0,23 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,06	0,10 ± 0,02 ^{a, b #}
18:3 n-6	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,00
18:3 n-3 (LNA)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
18:4 n-3	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,12	0,04 ± 0,03
20:0	1,61 ± 0,07	1,60 ± 0,03	1,58 ± 0,01	1,58 ± 0,04
20:1 n-7	0,02 ± 0,05	0,01 ± 0,02	0,10 ± 0,17	0,01 ± 0,03
20:1 n-9	0,01 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,05	0,02 ± 0,01
20:2 n-6	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,03
20:3 n-9	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01 ^{b, c}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 [#]
20:3 n-6	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,01
20:4 n-6 (AA)	0,09 ± 0,03	0,18 ± 0,06 ^{b, c}	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01 [#]
20:5 n-3 (EPA)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,01 ^{a, b #}
22:0	0,25 ± 0,05	0,35 ± 0,08	0,24 ± 0,01 ^{a, c}	0,32 ± 0,06
22:1 n-9	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,02 [#]
22:4 n-6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:5 n-6	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,02 ^{a, b}	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01 [#]
22:5 n-3	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,01 ^{a, b #}
22:6 n-3 (DHA)	0,34 ± 0,16	0,07 ± 0,04	0,23 ± 0,09 ^a	0,46 ± 0,08 ^{a, b #}
24:0	0,06 ± 0,04	0,24 ± 0,17	0,10 ± 0,09	0,21 ± 0,15
24:1	0,03 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,05	0,05 ± 0,05
Otros	0,93 ± 0,61	0,84 ± 0,22	0,87 ± 0,72	0,63 ± 0,23

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
Saturados	96,58 ± 0,96	96,91 ± 0,29	96,22 ± 1,73	96,87 ± 0,25
MUFA	1,51 ± 0,35	1,54 ± 0,24	2,06 ± 0,69	1,54 ± 0,05
PUFA	0,97 ± 0,32	0,71 ± 0,18	0,86 ± 0,33	0,96 ± 0,10
HUFA	0,71 ± 0,24	0,51 ± 0,16	0,61 ± 0,28	0,83 ± 0,14
Total de n-3	0,43 ± 0,20	0,08 ± 0,05	0,37 ± 0,24	0,61 ± 0,12 ^{a #}
Total de n-6	0,54 ± 0,16	0,61 ± 0,13	0,49 ± 0,09	0,35 ± 0,04 ^{a #}
Total de n-9	1,00 ± 0,19	1,08 ± 0,18	1,44 ± 0,49	1,07 ± 0,08
Ratio n-6/n-3	1,45 ± 0,58	10,40 ± 5,98 ^{a, b}	1,61 ± 0,64	0,59 ± 0,18 [#]
n-3: % de HUFA	58,34 ± 11,73	13,83 ± 4,98	57,18 ± 10,58 ^a	73,02 ± 2,78 ^{a, b #}

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos en el sarcolema de tejido muscular esquelético de ratones tras 18 meses de intervención dietética. Los resultados son la media ±SD de 4 animales, y se expresan como porcentaje sobre el total de ácidos grasos, a excepción de la ratio n-6/n-3 y el porcentaje de n-3 del total de HUFA (* p < 0,05 frente a la dieta *CR-Soy*; # p < 0,05 para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "a, b, c" p < 0,05 frente a las dietas *CR-Lard*, *CR-Soy* y *CR-Fish*, respectivamente).

Contenido de coenzima Q en la membrana plasmática

Como complemento a la información proporcionada por el análisis de ácidos grasos de la membrana plasmática y con el fin de profundizar en el estudio de su composición, procedimos a medir en esas mismas fracciones el contenido en coenzima Q₉ y Q₁₀, moléculas clave en el funcionamiento del sistema redox celular y con importancia en la señalización apoptótica a través de la vía extrínseca, inhibiendo la actividad esfingomielinasa neutra y reduciendo, en consecuencia, el estímulo proapoptótico proporcionado por la ceramida [251].

Los resultados obtenidos constatan que las intervenciones dietéticas empleadas no alteran de manera sustancial los niveles de coenzima Q₉ (**figura 15, A y B**) ni los de coenzima Q₁₀ (**figura 15, A y B**), con la única excepción del incremento en el contenido de ambas isoformas en el sarcolema de los animales alimentados con una dieta que incorpora aceite de pescado, y únicamente en el caso de los animales tratados durante 6 meses. El envejecimiento revierte este cambio y devuelve los niveles de Q₉ y Q₁₀ al entorno de los registros del resto de dietas y condiciones. De este modo, el contenido en coenzima Q₉ y Q₁₀, así como la suma de ambos (**figura 16, A y B**), es significativamente superior en la dieta *CR-Fish* con respecto al resto de las dietas para su mismo grupo de edad, y también a los animales viejos alimentados con la misma dieta.

Sometiendo los datos a un tratamiento estadístico que detectara una posible relación entre el ratio n-6/n-3 de los ácidos grasos presentes en las diferentes intervenciones dietéticas en restricción calórica y los valores de coenzima Q, se observa que existe una proporción directa entre ambos parámetros, estadísticamente significativa en los animales de 6 meses para ambas isoformas, y en los animales de 18 meses únicamente en el caso de la coenzima Q₁₀ (**figura 15, B y D**).

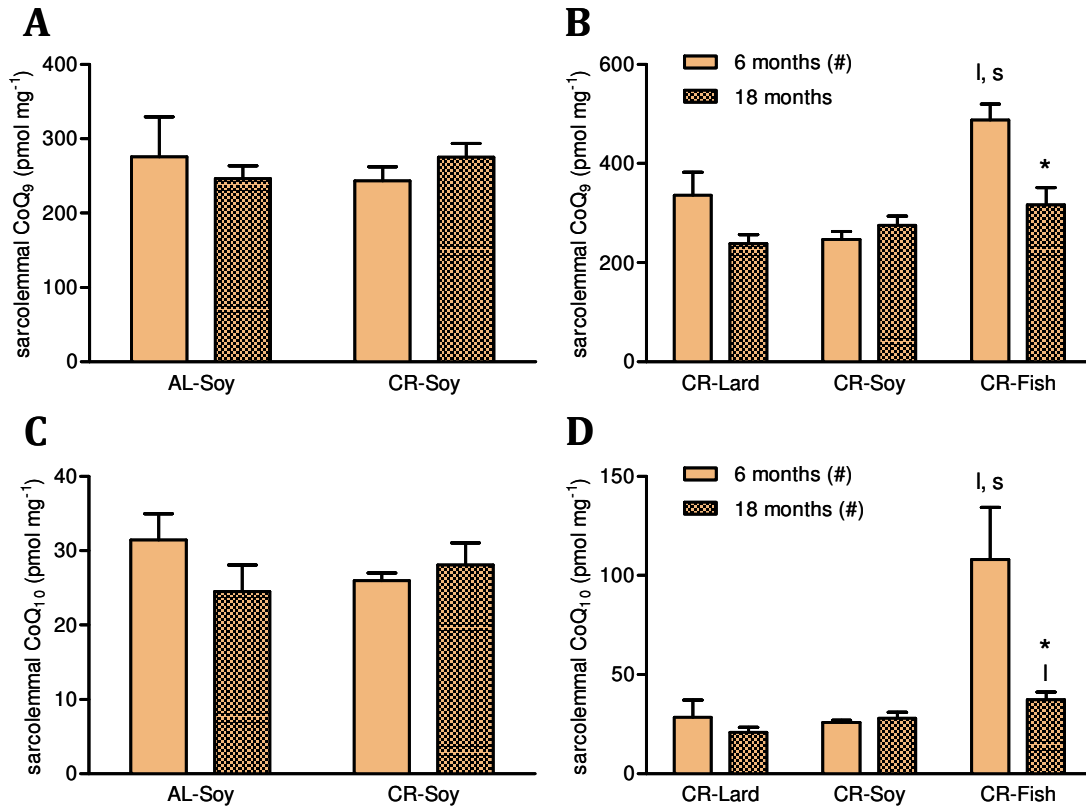


Figura 15. Coenzima Q₉ y Q₁₀ en el sarcolema. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles de coenzima Q₉ (A, B) y coenzima Q₁₀ (C, D) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p > 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "l, s", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Lard* y *CR-Soy* para esa misma edad, respectivamente).

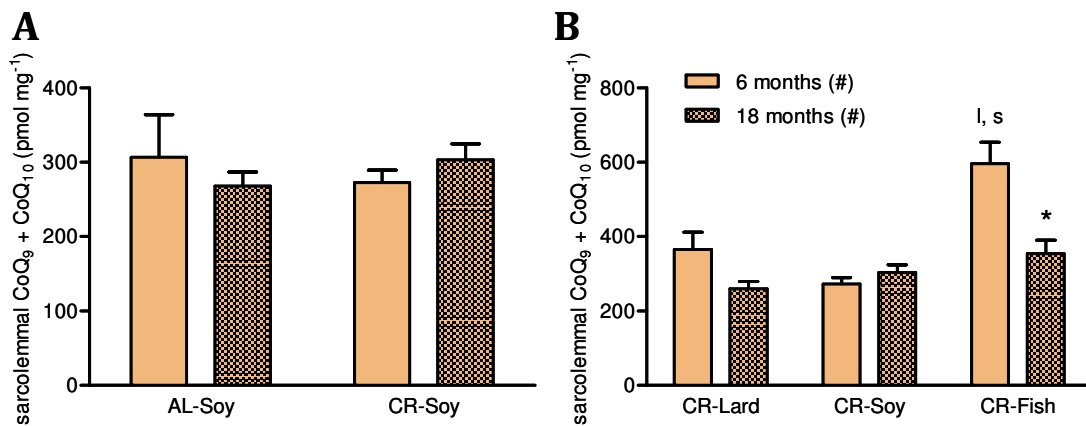


Figura 16. Suma del contenido en coenzima Q₉ y Q₁₀ del sarcolema. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "l,s", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Lard* y *CR-Soy* para esa misma edad).

La restricción calórica no causa ninguna variación en los niveles de coenzima Q del sarcolema a los 6 o a los 18 meses de edad, ni se asocia con un cambio en los efectos del envejecimiento.

La ratio coenzima Q_9 /coenzima Q_{10} , una medida simple de la abundancia relativa de ambas isoformas, tampoco sufre ninguna variación como resultado de la restricción calórica (**figura 17, A**). Al analizar el efecto del componente graso de la dieta (**figura 17, B**), observamos como dicha ratio es máxima en la dieta *CR-Lard*, intermedia en *CR-Soy* y mínima en *CR-Fish*, en los dos grupos de edad estudiados, existiendo una tendencia significativa para esta ordenación de las dietas en función de la ratio de ácidos grasos n-6/n-3. Además, se registra un incremento en la ratio Q_9/Q_{10} con el envejecimiento en el caso de la dieta que incorpora aceite de pescado.

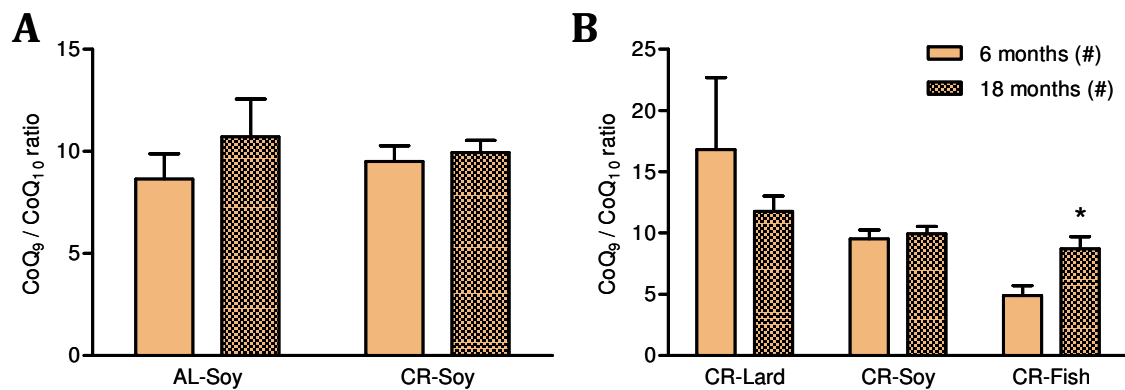


Figura 17. Ratio del contenido en coenzima Q_9 y Q_{10} del sarcolemma. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica).

Actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio

La actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio de la membrana plasmática es responsable, como se ha mencionado, de la producción de ceramidas que ejercen un efecto proapoptótico, influenciando tanto la ruta extrínseca como la ruta intrínseca de iniciación de la apoptosis. El estudio de esta actividad completa la caracterización del sarcolema por lo que se refiere a los objetivos del presente trabajo.

Nuestros resultados muestran un descenso de la actividad esfingomielinasa neutra en la membrana plasmática con el envejecimiento, de manera que todos los animales tratados durante 18 meses exhiben niveles muy similares de actividad, cualquiera que sea la dieta administrada, al tiempo que dichos niveles son inferiores a los obtenidos a los 6 meses de tratamiento (**figura 18, A y B**).

Es en los animales jóvenes donde encontramos variaciones como consecuencia de las distintas intervenciones dietéticas. La restricción calórica causa un descenso del 25% en la actividad esfingomielinasa neutra detectada en las fracciones enriquecidas en sarcolema. A su vez, y de manera consistente con los datos de contenido en coenzima Q en las membranas plasmáticas de los animales jóvenes, la dieta *CR-Fish* fue la que presentó menores niveles de actividad, siendo significativamente inferiores a los de las otras dos dietas con restricción calórica y diferente origen del componente graso.

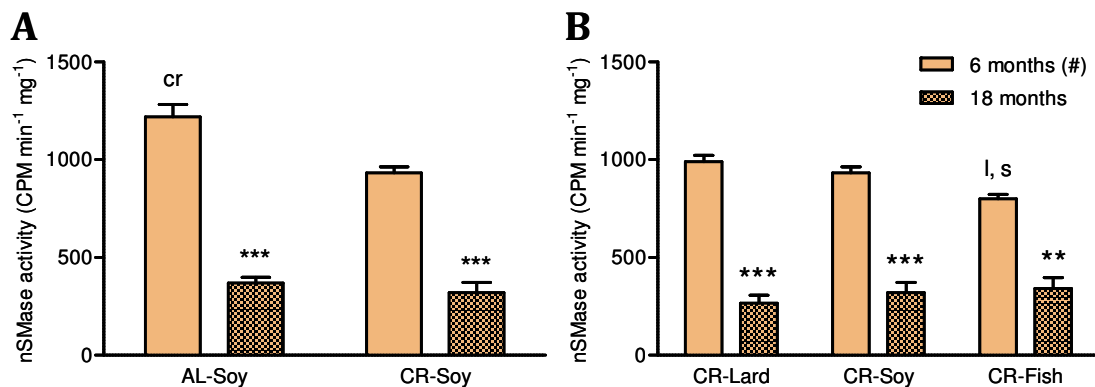


Figura 18. Actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio en membrana plasmática de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3-4 animales (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica; "l, s", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Lard* y *CR-Soy* para esa misma edad).

Índice apoptótico

Como introducción al estudio de las diferentes vías de señalización apoptótica, se llevó a cabo la determinación mediante ELISA de la presencia de fragmentos oligonucleosomales en la fracción citosólica, una característica de la existencia de núcleos apoptóticos en el tejido estudiado.

El índice apoptótico es bajo (en torno a 1 OD mg⁻¹) y estable en las diferentes edades y condiciones dietéticas analizadas. Contrariamente a lo esperado, no se detecta ningún cambio en el índice apoptótico debido a la restricción calórica o a las diferentes fuentes de grasa, ni tampoco existe un incremento del índice apoptótico muscular en los animales viejos (**figura 19**). No se aprecian asimismo tendencias claras, aun no siendo significativas, en ninguna de las pruebas estadísticas efectuadas. A pesar de estos resultados, en un estudio paralelo llevado a cabo en nuestro grupo de investigación se puso de manifiesto la existencia de modificaciones estructurales en las fibras musculares esqueléticas en función de la edad o de la dieta, potencialmente indicativas de diferencias en las tasas de apoptosis (ver Discusión). Por ello procedimos a estudiar posibles modificaciones en diversos componentes de los sistemas de señalización apoptótica en este tejido.

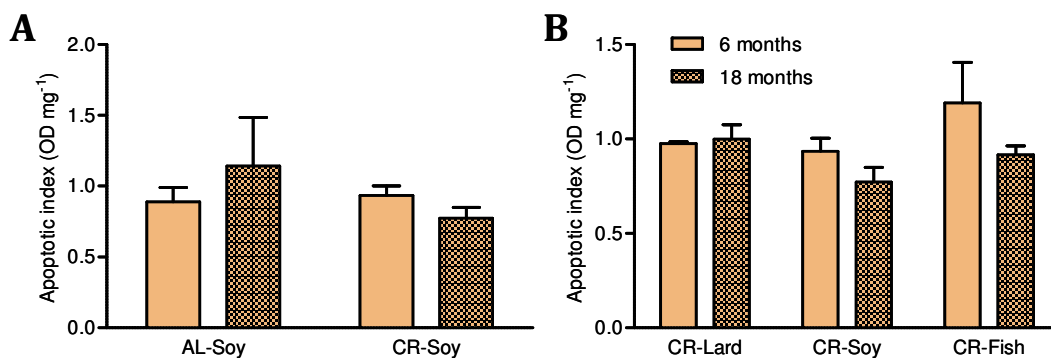


Figura 19. Índice apoptótico en músculo esquelético. Detección mediante ELISA de fragmentos oligonucleosomales en fracciones citosólicas. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales.

Niveles de proteínas de la familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son importantes reguladores de la muerte celular programada y el equilibrio entre algunos de sus componentes proapoptóticos y antiapoptóticos determina la activación de la vía intrínseca, mientras que otras proteínas de la familia se encargan de conectar entre sí diversas rutas de señalización apoptótica. Con el objetivo de realizar un primer análisis sobre el estado de dichas rutas en relación con la mitocondria, se midieron los niveles de Bcl-2 y Bax.

Los niveles de la proteína proapoptótica Bax fueron medidos mediante *western blot* e inmunodetección, apreciándose un importante descenso como consecuencia de la restricción calórica, tanto en animales jóvenes como en viejos. Una aparente tendencia al incremento de los niveles con la edad en las dietas con aceite de soja no resultó significativa en un análisis mediante ANOVA de dos vías, pero nuestros datos apoyan parcialmente la idea de que esas diferencias efectivamente existen en el caso de la dieta con restricción calórica. Así, en los datos extraídos del gel en el que se estudian los efectos de la restricción calórica y el envejecimiento (**figura 20, A y C**) no encontramos diferencias significativas por un estrecho margen ($p = 0,0525$), mientras que en el gel que se muestra como ejemplo de la influencia combinada del envejecimiento y el tipo de grasa de la dieta (**figura 20, B y D**), dichas diferencias sí son estadísticamente relevantes ($p = 0,0185$).

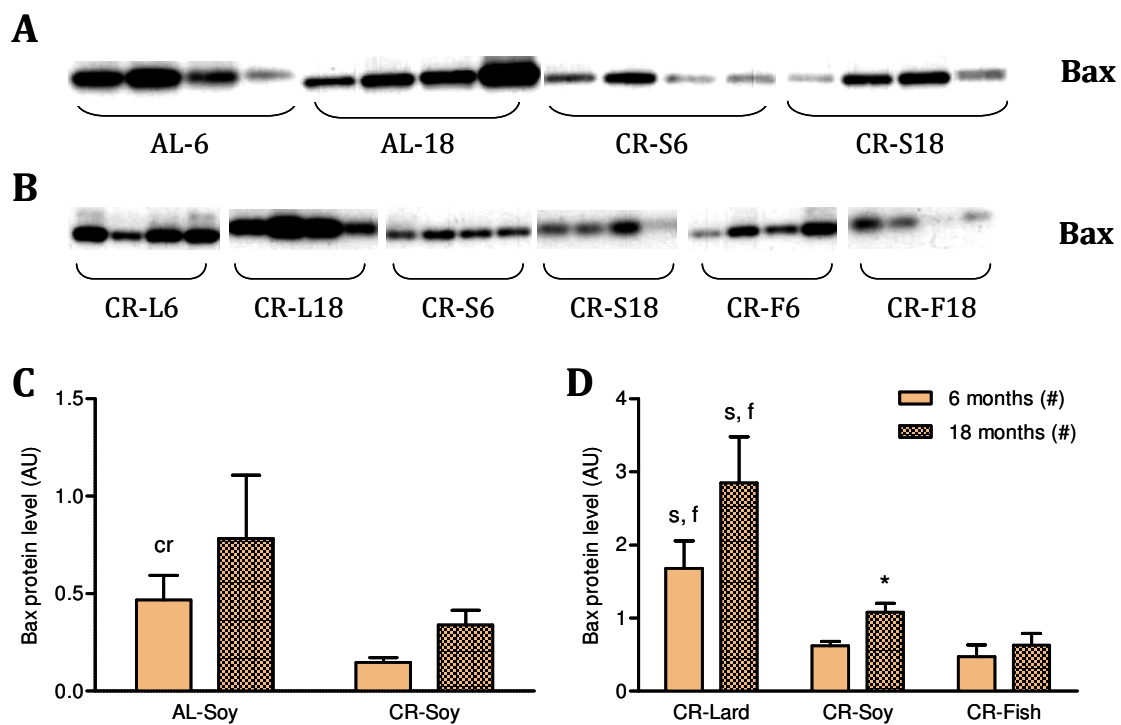


Figura 20. Niveles de Bax en músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica (A, C) y el origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento, La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas CR; "s, f", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Soy* y *CR-Fish* de su mismo grupo de edad).

Hemos podido comprobar cómo el origen del componente graso de la dieta afecta notablemente a los niveles de Bax. En las dos edades estudiadas, la dieta *CR-Lard* con grasa animal se asoció a una mayor presencia de Bax, existiendo diferencias significativas con las otras dos dietas y estableciéndose en ambos casos una tendencia lineal de proporcionalidad directa con la ratio n-6/n-3 de los ácidos grasos de las dietas de restricción calórica.

De la misma forma, como se muestra en la **figura 21**, medimos mediante *western blot* e inmunotinción los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en homogeneizados totales de músculo esquelético. De acuerdo con nuestros resultados, la restricción calórica no influye sobre Bcl-2 en ninguna de las edades estudiadas. Desde una perspectiva más amplia, sin embargo, se observa un efecto interesante de la acción combinada de la restricción calórica y el envejecimiento: mientras que no hay cambios con la edad en el caso de la dieta *AL-Soy*, las tres intervenciones dietéticas con restricción calórica muestran un incremento en los niveles de Bcl-2 a los 18 meses, en comparación con los animales jóvenes. Cabe señalar la circunstancia de que no en todas las repeticiones de la comparación de ambas edades en la dieta *CR-Soy* las diferencias resultaron significativas, como ya se ha explicado anteriormente. El ANOVA de dos vías señala la edad como una fuente de variación extremadamente significativa al estudiar por separado las dietas CR ($p < 0,0001$).

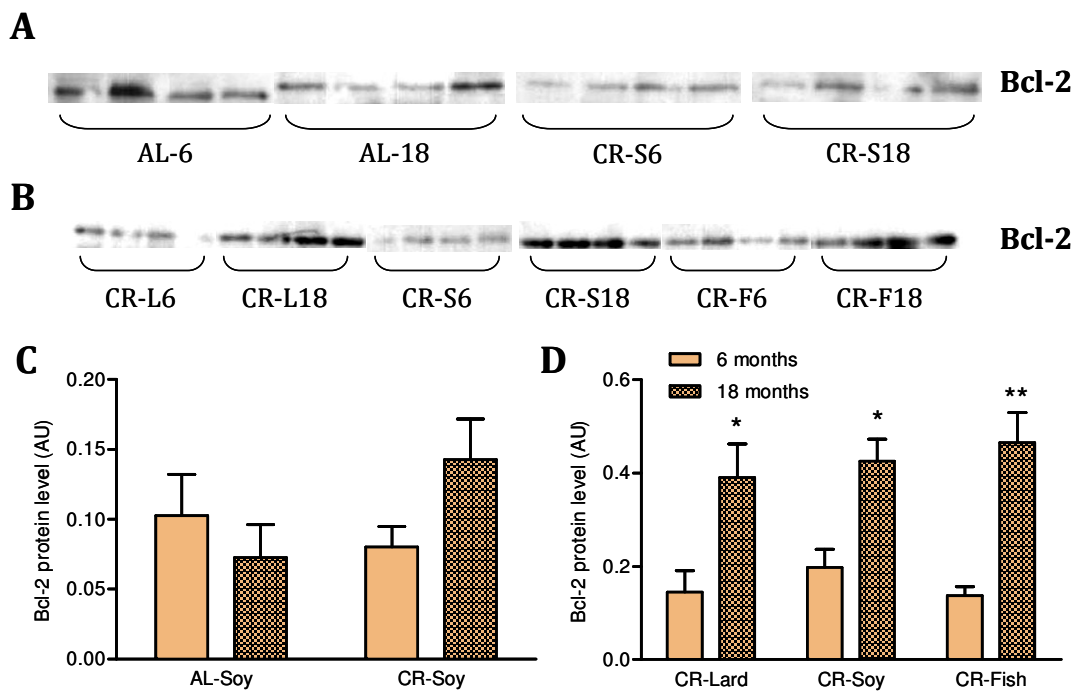


Figura 21. Niveles de Bcl-2 en músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica (A, C) y el origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento).

Las diferentes fuentes de grasa de la dieta no se asocian con diferencias para ninguno de los grupos de edad, ni tampoco con variaciones en la respuesta al envejecimiento.

Dada la importancia de la abundancia relativa de ambas proteínas, debido a su mecanismo de acción basado en la formación de homo y heterodímeros y oligómeros, consideramos de interés el cálculo de la ratio Bcl-2/Bax a partir de las densidades ópticas obtenidas para los mismos individuos estudiados en ambos casos.

Podemos observar una tendencia al incremento de la ratio Bcl-2/Bax tanto a los 6 como a los 18 meses de intervención, en los animales sometidos a restricción calórica con respecto a los controles *AL-Soy*.

Combinando de esta manera los datos relativos a Bcl-2 y a Bax, el incremento de los valores de Bcl-2 con el envejecimiento queda atenuado por el aumento correspondiente en los niveles de Bax, dando como resultado que la diferente edad de los animales no se asocia con diferencias en la ratio Bcl-2/Bax.

No obstante, las diversas fuentes del componente graso de la dieta sí ejercen una notable influencia sobre dicha ratio, que aumenta de manera inversamente proporcional a la ratio n-6/n-3 de los ácidos grasos de la dieta (**figura 22**), por tomar un parámetro de referencia que nos permite ordenar las dietas en el sentido *CR-Lard* – *CR-Soy* – *CR-Fish*. De esta forma, y refiriéndonos a la ruta intrínseca de la apoptosis, el ambiente más proapoptótico lo encontramos, para ambas edades, en la dieta *CR-Lard*.

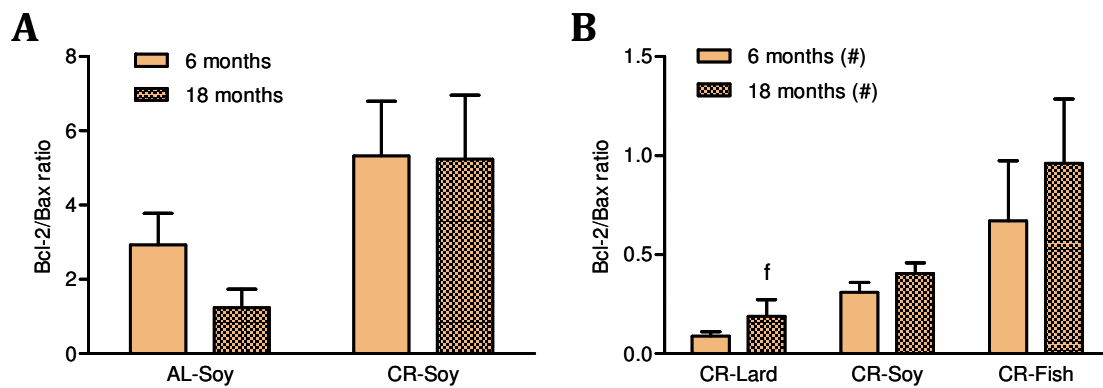


Figura 22. Ratio Bcl-2/Bax en músculo esquelético. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (# $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "f", $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Fish* de su mismo grupo de edad).

Liberación al citosol de AIF y citocromo *c*

El equilibrio de las proteínas de la familia Bcl-2 determina la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y la consiguiente salida al citosol de numerosos factores que intervienen en la señalización apoptótica, como se describe en la Introducción. Así, la concentración citosólica de citocromo *c* y AIF es representativa del grado de activación de las rutas apoptóticas dependientes e independientes de caspasas, respectivamente. Ambos parámetros fueron medidos mediante inmunotinción tras separación por electroforesis.

Como se muestra en la **figura 23 (C)**, hemos podido observar que la presencia de citocromo *c* en el citosol de las fibras musculares se ve disminuida debido a la restricción calórica en animales jóvenes. Aunque el tipo de grasa de la dieta parece no tener ningún efecto significativo dentro de un mismo grupo de edad, el grupo *CR-Soy* es el único en el que no se registra un aumento drástico de los niveles citosólicos de citocromo *c*, que llegan a duplicarse a los 18 meses de tratamiento en las dietas *CR-Lard* y *CR-Fish*.

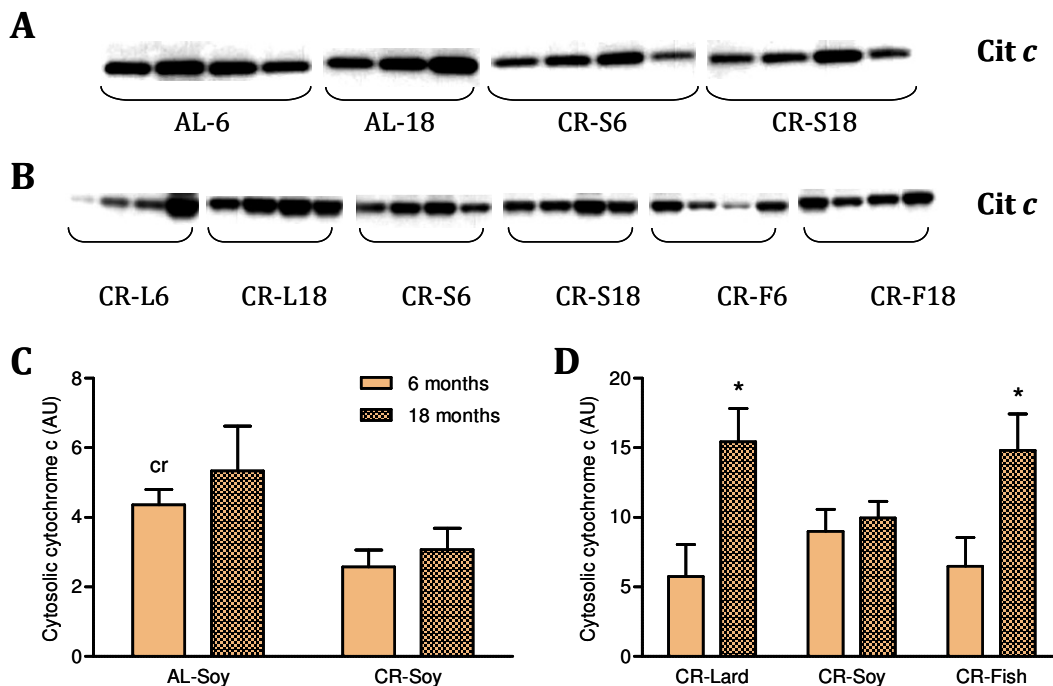


Figura 23. Niveles de citocromo *c* en citosol de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica (A, C) y el origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica).

En el caso de la proteína AIF, al igual que ocurre con el citocromo *c*, en animales jóvenes disminuyen los niveles citosólicos de AIF debido a la restricción calórica.

Sin embargo, el envejecimiento o el origen del componente graso de la dieta no parecen tener ningún efecto sobre la liberación de AIF al citosol en músculo esquelético, de acuerdo con nuestros resultados (**figura 24**).

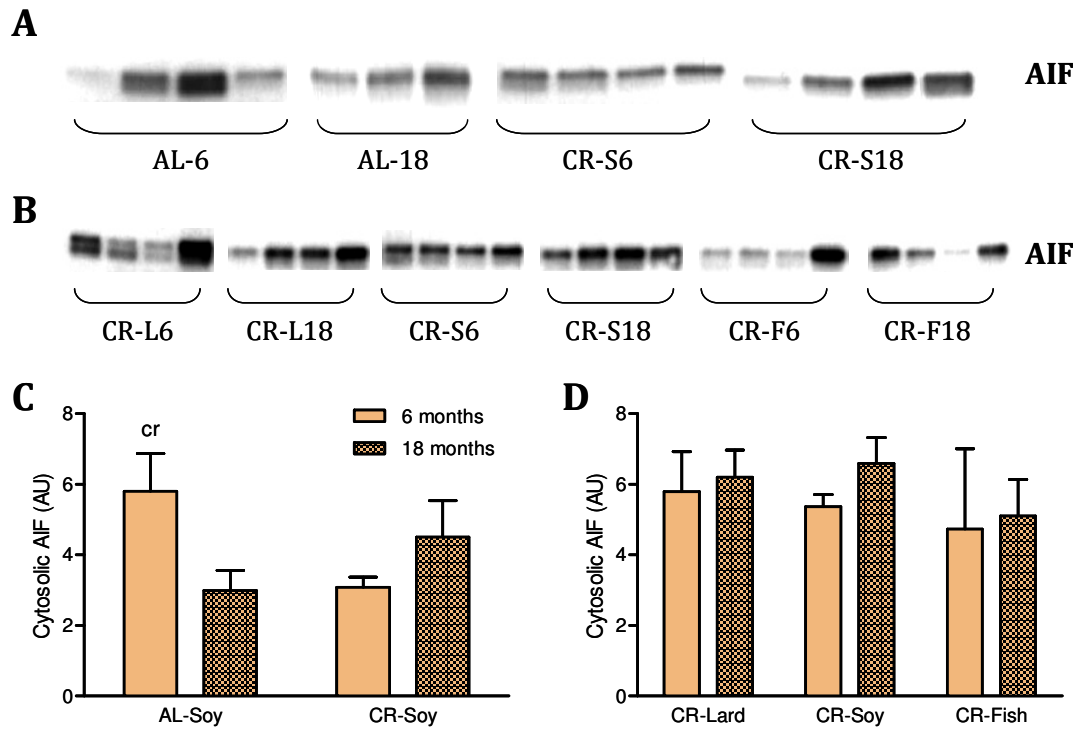


Figura 24. Niveles de AIF en citosol de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica (A, C) y el origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales ("cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica).

Niveles de XIAP

Los niveles de la proteína XIAP, perteneciente a la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis, presentan unas variaciones similares a los parámetros anteriormente mencionados. Su capacidad de inhibir la actividad de las caspasas -9 y -3, entre otras, hacen necesario su estudio para comprender la dinámica de las cascadas de señalización.

Al igual que sucedía con los niveles citosólicos de citocromo *c* y AIF, la restricción calórica reduce en los animales jóvenes la presencia de XIAP (**figura 25, C**), mientras que el resto de condiciones estudiadas, incluyendo edad y tipo de grasa de la dieta, no tuvieron efecto alguno sobre dicha proteína.

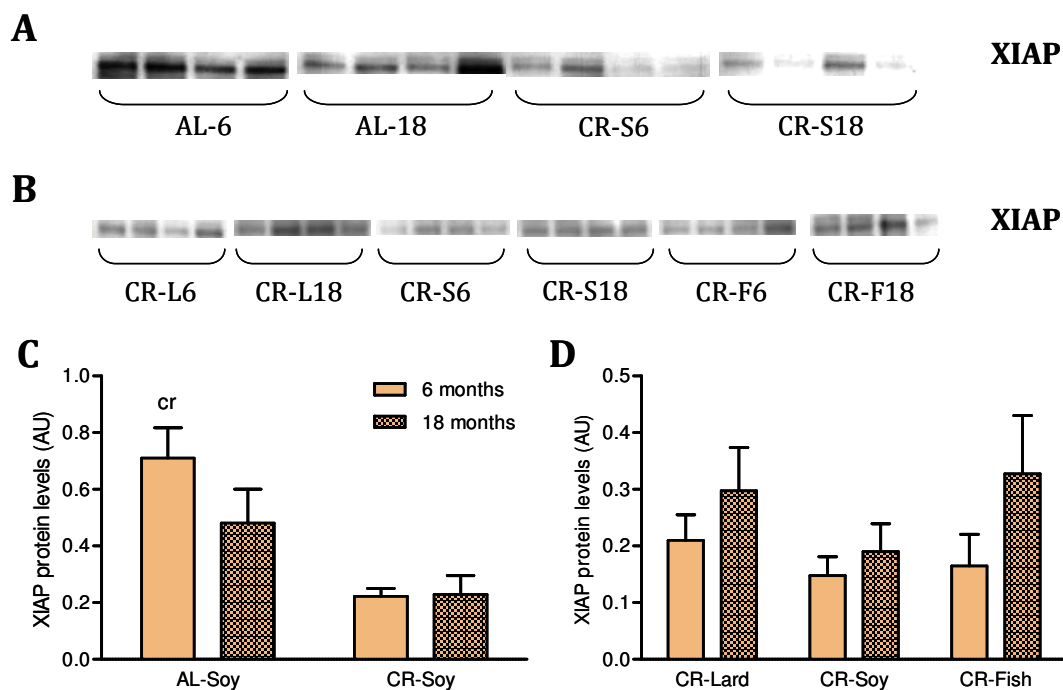


Figura 25. Niveles de XIAP en homogeneizados totales de músculo esquelético. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales ("cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica).

Actividades proteasa vinculadas a la apoptosis

Las proteasas conocidas genéricamente como caspasas constituyen piezas clave de la regulación de la apoptosis, en la mayoría de sus vías de activación. Mediante ensayos fluorimétricos se estudió la actividad de algunas de las caspasas mejor caracterizadas y más relevantes. La caspasa-3 es considerada la principal caspasa efectora, y en su activación participan caspasas iniciadoras como son la caspasa-8, que media la transducción de las señales de muerte celular desde los receptores de la membrana plasmática, y la caspasa-9, que como consecuencia de la permeabilización de la membrana mitocondrial se asocia a Apaf-1 y al citocromo *c* para formar el apoptosoma.

A los seis meses de edad, el patrón de actividad de la caspasa-9 (**figura 27**) en las distintas dietas no difiere del de la caspasa-8 (**figura 26**). Así, no se registra cambio alguno debido a la restricción calórica, pero se observa una tendencia estadísticamente significativa entre las tres dietas con diferentes fuentes de grasa, de manera que en ambos casos la dieta con manteca de cerdo presenta unos niveles de actividad superiores a los de la dieta con aceite de pescado, en relación directa con la ratio de ácidos grasos n-6/n-3. Sin embargo, estos cambios en las caspasas señaladoras no encuentran reflejo en la caspasa-3, que se mantiene invariable en todas las condiciones a los seis meses de tratamiento.

Después de 18 meses de intervención dietética, la restricción calórica muestra un efecto de inducción en la actividad de la caspasa-9, mientras que la caspasa-8 se mantiene invariable. Resulta llamativa la inversión de las tendencias dependientes de la fuente de la grasa observadas en los animales jóvenes: pasa a existir una relación inversa con la ratio de ácidos grasos n-6/n-3, dado que la dieta *CR-Fish* muestra unos niveles de actividad por encima del resto de dietas.

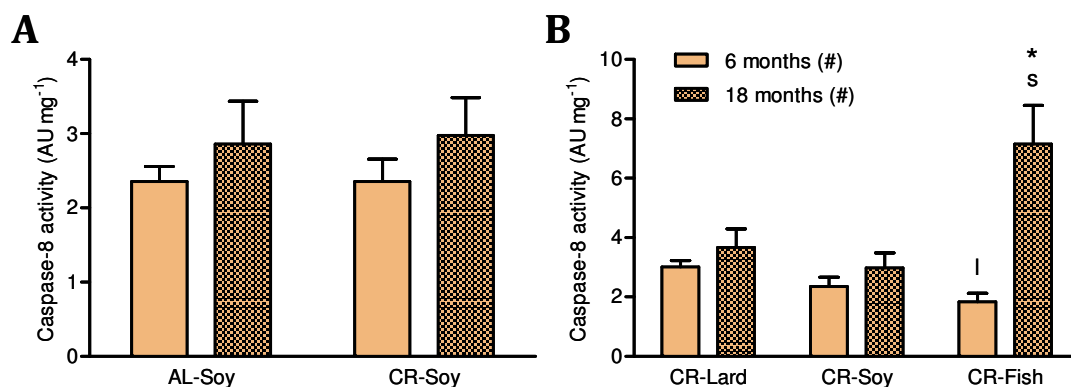


Figura 26. Actividad de la caspasa-8. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (#, $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; l, $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Lard* de su mismo grupo de edad; s, $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Lard* de su misma edad).

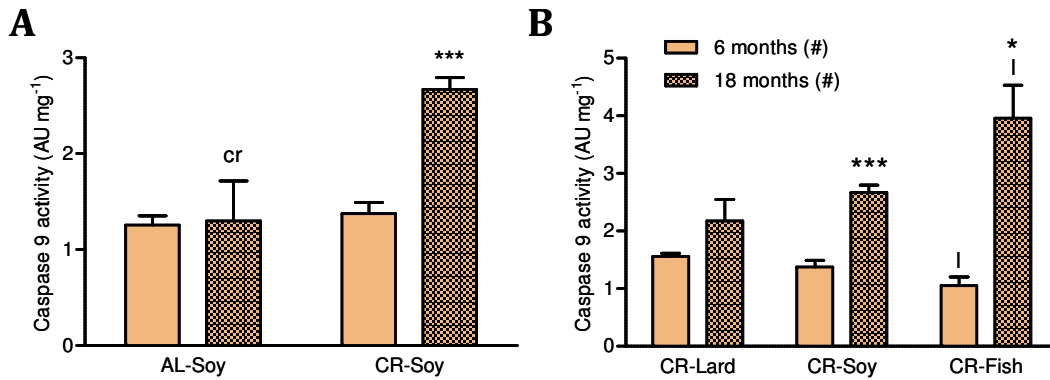


Figura 27. Actividad de la caspasa-9. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (*, $p < 0,05$ frente a la misma dieta a los 6 meses de tratamiento; ***, $p < 0,001$ frente a 6 meses; cr, $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Soy*; #, $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; l, $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Lard* de su mismo grupo de edad).

Al observar el efecto del envejecimiento sobre cada dieta, esta inversión de las tendencias tiene como resultado que, mientras en el caso del tratamiento *CR-Lard* la actividad se mantiene sin cambios, los animales sometidos a restricción calórica con aceite de soja duplican su actividad caspasa-9. Los animales alimentados con la dieta *CR-Fish* presentan una actividad de las caspasas -8 y -9 cuatro veces mayor a los 18 meses de tratamiento que a los 6 meses.

La caspasa-3 muestra diferentes respuestas al envejecimiento en función del tipo de dieta (**figura 28**). La actividad se duplica en los animales viejos del grupo *CR-Fish*, registrándose un aumento algo menor en el caso del grupo *CR-Soy*. Observamos la misma tendencia que en el resto de caspasas estudiadas, inversamente correlacionada con el ratio n-6/n-3 de los ácidos grasos de la dieta.

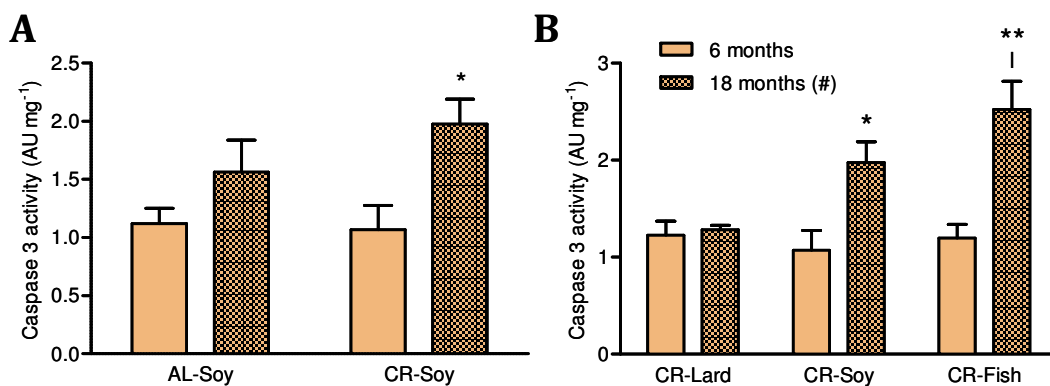


Figura 28. Actividad de la caspasa-3. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (*, $p < 0,05$ y **, $p < 0,01$ frente a la misma dieta a los 6 meses de tratamiento; #, $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; l, $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Lard* de su mismo grupo de edad).

Efectos de las intervenciones dietéticas y el envejecimiento sobre el hígado

Una vez completado el estudio sobre un órgano con escasa capacidad regenerativa, como el músculo esquelético, abordamos el análisis de otro con unas características completamente diferentes. Los hepatocitos son células metabólicamente muy activas, con una gran número de funciones en cuanto a procesamiento de azúcares, detoxificación y procesamiento de los nutrientes que llegan al hígado desde el intestino, lo que les convierte en células muy expuestas a las moléculas procedentes de la dieta. Además, su capacidad de proliferación y recambio es muy elevada.

Obtención de fracciones enriquecidas en membrana plasmática

Empleando la metodología descrita, obtuvimos fracciones enriquecidas en membrana plasmática de células hepáticas, para proceder a una caracterización análoga a la realizada en el caso del músculo esquelético. El contenido de Na⁺/K⁺ ATPasa en las fracciones de membrana plasmática fue 8 veces superior al del homogeneizado total (**figura 29**).

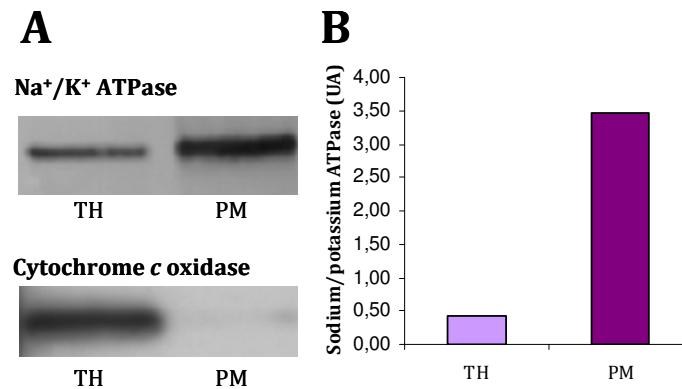


Figura 29. Fracciones enriquecidas en membrana plasmática. Se muestra la inmunodetección (A) de un marcador de membrana plasmática, la Na⁺/K⁺ ATPasa, y de la enzima mitocondrial citocromo *c* oxidasa en muestras de homogeneizado total (TH) y fracciones enriquecidas en membrana plasmática (PM). La normalización con la carga de proteína muestra un enriquecimiento (B) en el contenido de membrana plasmática.

Composición de la membrana plasmática: análisis de ácidos grasos

El análisis del perfil de ácidos grasos presentes en las fracciones enriquecidas en membrana plasmática de hígado (**tablas 8 y 9**) muestra que, a pesar de las mencionadas diferencias entre ambos órganos, y de su muy distinta estructura, la composición de ácidos grasos de las membranas plasmáticas es muy parecida. Resulta coincidente la predominancia de los ácidos grasos saturados, que suponen el 95-97% del total, de entre los cuales son el esteárico y el palmítico los más abundantes, con un 63-64% y un 28%, respectivamente, con ligeras variaciones en función de la dieta y de la edad, sin que se encuentren diferencias significativas.

En lo referente a los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), las únicas diferencias significativas se producen debido al envejecimiento (**figura 30**), que causa un descenso en la presencia de MUFA en el caso de las dietas basadas en aceite de soja (AL-Soy y CR-Soy).

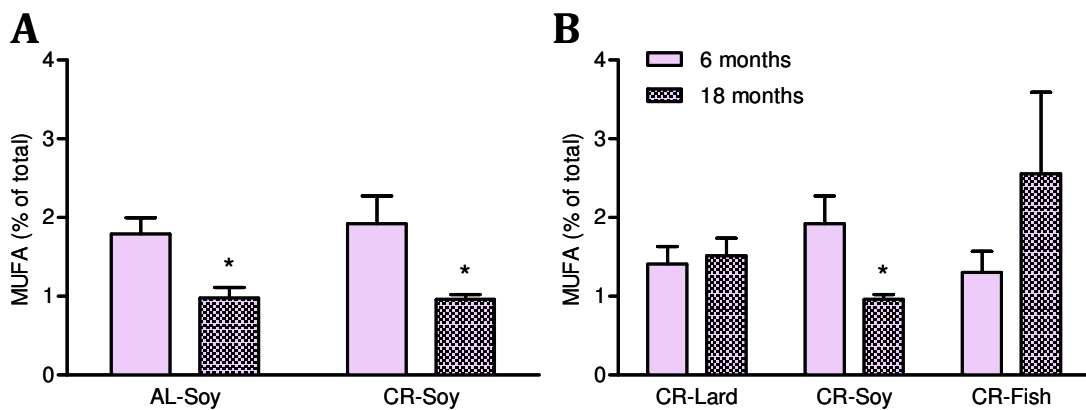


Figura 30. Total de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) en la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento).

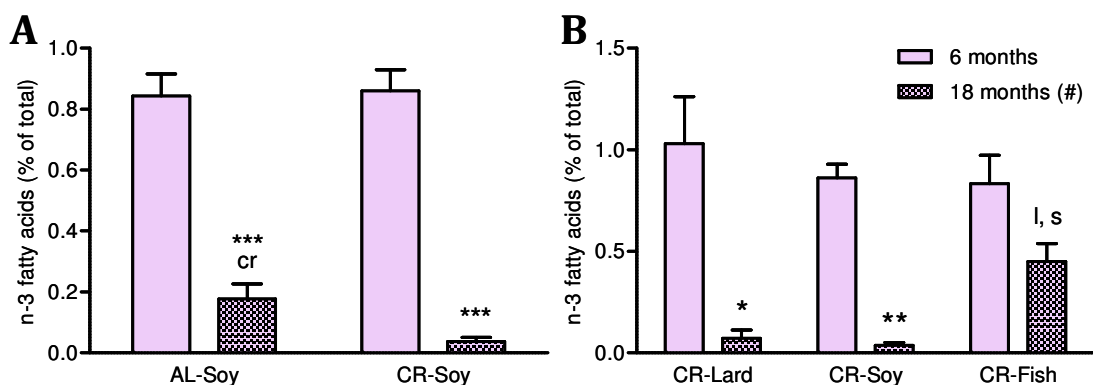


Figura 31. Total de ácidos grasos de la serie n-3 en la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr", $p < 0,05$ frente a la dieta CR-Soy de la misma edad; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "l,s", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-Lard y CR-Soy para esa misma edad).

El nivel total de PUFA varía con la dieta y la edad. En los animales jóvenes hay una tendencia significativa entre las dietas CR: la membrana plasmática en la dieta *CR-Fish* presenta un 40% menos de PUFA que en la *CR-Lard*, con el grupo *CR-Soy* mostrando niveles intermedios. En los animales viejos, la única diferencia entre dietas es el valor más bajo de *CR-Soy* con respecto a *CR-Fish* (y al resto de las dietas, aunque sin significación estadística). Como consecuencia del envejecimiento, sin embargo, se observa un descenso en todas las dietas, pero con una menor intensidad en *CR-Fish*, donde las diferencias no llegan a ser significativas (**tablas 8 y 9**).

La restricción calórica tiene unos efectos muy limitados sobre el perfil lipídico. En los animales jóvenes únicamente varían algunos MUFA, de forma que el ácido graso 20:1 n-9 parece ser sustituido por 22:1 n-9 en los animales *CR-Soy*. En el caso de los animales sometidos a 18 meses de CR, se aprecia una mayor incidencia de la dieta sobre los PUFA de cadena larga. La restricción calórica disminuye la presencia del total de ácidos grasos n-3 (**figura 31**), del ácido docosahexaenoico, del linoleico y del araquidónico (estos últimos, de la serie n-6). No hay un descenso general de los HUFA debido a que el ácido graso 18:3 n-6 está incluido en este grupo, y sus niveles se mantienen todas las dietas. Como consecuencia, aumenta significativamente la proporción n-6/n-3 (**tabla 9**).

La variación del tipo de grasa de la dieta tuvo su efecto, principalmente, sobre la presencia en la membrana plasmática de los ácidos grasos poliinsaturados de las series n-6 y n-3. En términos generales, se observa una tendencia de ambos grupos a reflejar el contenido relativo de las dietas suministradas (mayor ratio n-6/n-3 en *CR-Lard*, menor en *CR-Fish*), a excepción del precursor de la serie n-3, el LNA, que decrece en *CR-Fish* y desaparece en todas las dietas en los animales viejos. El ácido graso n-3 biológicamente más relevante por sus efectos antiinflamatorios, el EPA, mantiene unos niveles más altos en la dieta con aceite de pescado, independientemente de la edad, mientras que está prácticamente ausente en las demás dietas, especialmente en los animales viejos (**figura 32**). La cantidad de HUFA pertenecientes a la serie n-3 a los 18 meses de dieta oscila entre el 10% en el grupo *CR-Lard* (frente al 53% en los jóvenes) y el 62% en el *CR-Fish* (68% en los jóvenes).

El ácido araquidónico, además de disminuir por la restricción calórica en animales viejos, como se ha señalado, reduce su presencia en las membranas en todas las dietas como consecuencia del envejecimiento, salvo en el grupo *CR-Fish*, donde los niveles ya eran mínimos en los animales jóvenes (**figura 33**).

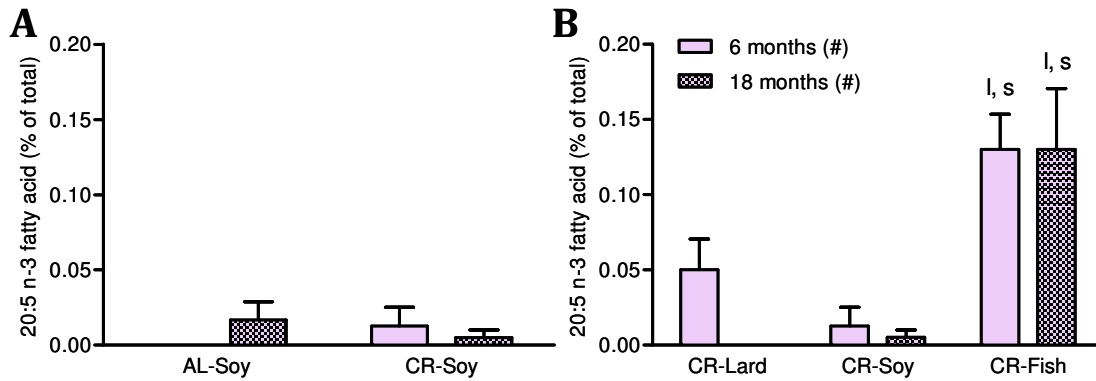


Figura 32. Presencia de ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3) en la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (# $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "l,s", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-Lard y CR-Soy para esa misma edad).

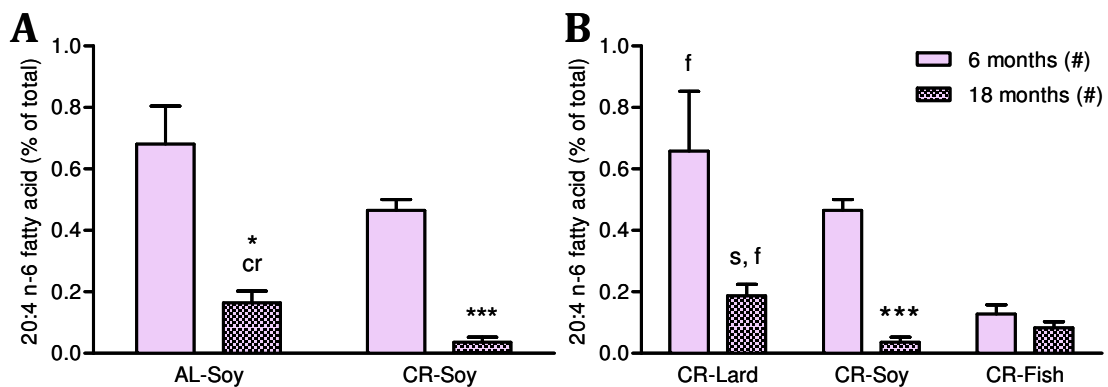


Figura 33. Presencia de ácido araquidónico (20:4 n-6) en la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como porcentaje del total de ácidos grasos, y usando la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr", $p < 0,05$ frente a la dieta CR-Soy de la misma edad; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "l,s", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-Lard y CR-Soy para esa misma edad).

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
12:0	0,13 ± 0,15	0,31 ± 0,41	0,37 ± 0,39	0,05 ± 0,04
14:0	1,16 ± 0,10	1,16 ± 0,15	1,19 ± 0,11	1,10 ± 0,14
14:1	0,10 ± 0,07	0,10 ± 0,07	0,17 ± 0,12	0,02 ± 0,03
15:0	0,23 ± 0,04	0,25 ± 0,14	0,22 ± 0,08	0,21 ± 0,05
15:1	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,08 ± 0,05	0,07 ± 0,05
16:0	28,23 ± 0,41	28,16 ± 0,25	28,32 ± 0,50	28,10 ± 0,30
16:1 n-7	0,24 ± 0,07	0,14 ± 0,05	0,19 ± 0,09	0,27 ± 0,22
17:1	0,04 ± 0,05	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,05	0,03 ± 0,03
18:0	63,78 ± 1,11	62,44 ± 1,54	62,82 ± 1,36	64,27 ± 1,24
18:1 n-9	1,03 ± 0,22	0,68 ± 0,48	1,07 ± 0,38	0,58 ± 0,38
18:2 n-6 (LA)	0,47 ± 0,13	0,41 ± 0,19	0,43 ± 0,06	0,22 ± 0,08
18:3 n-6	0,10 ± 0,11	0,11 ± 0,07	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,01
18:3 n-3 (LNA)	0,40 ± 0,07	0,41 ± 0,08	0,39 ± 0,03	0,29 ± 0,03 ^{a #}
18:4 n-3	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,04
20:0	1,71 ± 0,03	1,75 ± 0,19	1,71 ± 0,07	1,72 ± 0,04
20:1 n-7	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:1 n-9	0,22 ± 0,09 [*]	0,11 ± 0,07	0,09 ± 0,04	0,12 ± 0,03
20:2 n-6	0,07 ± 0,06	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,02
20:3 n-9	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:3 n-6	0,17 ± 0,06	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,02 ± 0,02 ^{a, b #}
20:4 n-6 (AA)	0,68 ± 0,25	0,66 ± 0,39	0,46 ± 0,07	0,13 ± 0,06 ^{a #}
20:5 n-3 (EPA)	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,04	0,01 ± 0,02	0,13 ± 0,05 ^{a, b #}
22:0	0,05 ± 0,10 [*]	0,31 ± 0,17	0,33 ± 0,08	0,26 ± 0,10
22:1 n-9	0,04 ± 0,08 [*]	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,05	0,16 ± 0,01
22:4 n-6	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,06 ± 0,03
22:5 n-6	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:5 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,04	0,06 ± 0,07
22:6 n-3 (DHA)	0,37 ± 0,07	0,53 ± 0,47	0,40 ± 0,17	0,29 ± 0,20
24:0	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00
24:1	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,11	0,09 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Otros	0,60 ± 0,25	1,79 ± 1,08	1,06 ± 0,42	1,55 ± 0,98

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
Saturados	95,28 ± 0,90	94,42 ± 1,40	94,98 ± 1,35	95,71 ± 0,78
MUFA	1,79 ± 0,41	1,41 ± 0,44	1,92 ± 0,71	1,30 ± 0,55
PUFA	2,34 ± 0,59	2,39 ± 0,76	2,04 ± 0,24	1,43 ± 0,41 [#]
HUFA	1,79 ± 0,45	1,93 ± 0,64	1,57 ± 0,17	1,20 ± 0,35
Total de n-3	0,84 ± 0,14	1,03 ± 0,46	0,86 ± 0,14	0,83 ± 0,28
Total de n-6	1,49 ± 0,46	1,36 ± 0,67	1,18 ± 0,14	0,60 ± 0,14 ^{b, #}
Total de n-9	1,44 ± 0,39	1,16 ± 0,40	1,61 ± 0,59	0,93 ± 0,41
Ratio n-6/n-3	1,75 ± 0,35	1,48 ± 0,82	1,39 ± 0,19	0,75 ± 0,12
n-3: % de HUFA	47,91 ± 7,06	53,48 ± 13,62	54,74 ± 3,71	68,70 ± 3,42 [#]

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos en la membrana plasmática de hígado tras 6 meses de intervención dietética. Los resultados son la media ±SD de 4 animales, y se expresan como porcentaje sobre el total de ácidos grasos, a excepción de la ratio n-6/n-3 y el porcentaje de n-3 del total de HUFA (* p < 0,05 frente a la dieta CR-Soy; # p < 0,05 para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "a, b, c" p < 0,05 frente a las dietas CR-Lard, CR-Soy y CR-Fish, respectivamente).

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
12:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
14:0	0,86 ± 0,17	0,85 ± 0,25	0,84 ± 0,13	1,18 ± 0,06 ^{a, b#}
14:1	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,12
15:0	0,15 ± 0,02 [*]	0,14 ± 0,01	0,22 ± 0,02 ^{a, c}	0,15 ± 0,01
15:1	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01
16:0	29,47 ± 0,53	28,85 ± 1,11	28,87 ± 0,74	29,53 ± 0,94
16:1 n-7	0,13 ± 0,00	0,23 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,33 ± 0,04 ^{a, b#}
17:1	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,06 ± 0,02
18:0	64,89 ± 0,95	64,69 ± 0,71	64,01 ± 0,70	62,87 ± 2,84
18:1 n-9	0,57 ± 0,09	0,91 ± 0,26	0,56 ± 0,02	1,62 ± 1,64
18:2 n-6 (LA)	0,21 ± 0,09 [*]	0,14 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,17 ± 0,02 ^b
18:3 n-6	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,02
18:3 n-3 (LNA)	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00
18:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,18
20:0	1,62 ± 0,02	1,61 ± 0,01	1,70 ± 0,08	1,56 ± 0,03 ^b
20:1 n-7	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,19
20:1 n-9	0,04 ± 0,04	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,09 ± 0,10
20:2 n-6	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01
20:3 n-9	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,07	0,00 ± 0,00
20:3 n-6	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,04	0,02 ± 0,03	0,00 ± 0,00
20:4 n-6 (AA)	0,16 ± 0,07 [*]	0,19 ± 0,07 ^{b, c}	0,04 ± 0,03	0,08 ± 0,04 [#]
20:5 n-3 (EPA)	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,13 ± 0,08 ^{a, b#}
22:0	0,41 ± 0,15	0,41 ± 0,33	0,58 ± 0,31	0,26 ± 0,02
22:1 n-9	0,15 ± 0,06	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,06	0,13 ± 0,01
22:4 n-6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:5 n-6	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02 ^{b, c}	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00 [#]
22:5 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02
22:6 n-3 (DHA)	0,16 ± 0,07 [*]	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,22 ± 0,09 ^{a, b#}
24:0	0,24 ± 0,15	0,18 ± 0,13	0,59 ± 0,49	0,40 ± 0,64
24:1	0,07 ± 0,06	0,07 ± 0,05	0,04 ± 0,06	0,10 ± 0,02
Otros	0,63 ± 0,37	1,07 ± 1,14	1,84 ± 0,50	0,65 ± 0,58

	<i>AL-Soy</i>	<i>CR-Lard</i>	<i>CR-Soy</i>	<i>CR-Fish</i>
Saturados	97,64 ± 0,24	96,72 ± 1,58	96,82 ± 0,79	95,95 ± 2,70
MUFA	0,97 ± 0,24	1,51 ± 0,45	0,96 ± 0,12	2,56 ± 2,08
PUFA	0,76 ± 0,28	0,70 ± 0,27	0,38 ± 0,18	0,84 ± 0,17 ^b
HUFA	0,53 ± 0,17	0,54 ± 0,22	0,30 ± 0,15	0,70 ± 0,19
Total de n-3	0,18 ± 0,09 [*]	0,07 ± 0,08	0,04 ± 0,03	0,45 ± 0,17 ^{a, b#}
Total de n-6	0,58 ± 0,20	0,59 ± 0,18 ^b	0,30 ± 0,10	0,39 ± 0,05
Total de n-9	0,83 ± 0,25	1,20 ± 0,37	0,76 ± 0,10	2,07 ± 1,84
Ratio n-6/n-3	3,46 ± 0,54 [*]	30,73 ± 43,59	6,50 ± 1,36	1,04 ± 0,60
n-3: % de HUFA	32,43 ± 5,84 [*]	9,96 ± 11,11	11,89 ± 9,08	62,35 ± 11,06 ^{a, b#}

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos en la membrana plasmática de hígado tras 18 meses de intervención dietética. Los resultados son la media ±SD de 4 animales, y se expresan como porcentaje sobre el total de ácidos grasos, a excepción de la ratio n-6/n-3 y el porcentaje de n-3 del total de HUFA (* p < 0,05 frente a la dieta CR-Soy; # p < 0,05 para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "a, b, c" p < 0,05 frente a las dietas CR-Lard, CR-Soy y CR-Fish, respectivamente).

Contenido de coenzima Q en la membrana plasmática

Para profundizar en la caracterización de los lípidos presentes en la membrana plasmática y, como ya se ha remarcado, debido a su importancia en la señalización apoptótica, se determinaron los niveles de coenzima Q₉ y Q₁₀ en muestras de fracciones enriquecidas en dicha membrana.

La restricción calórica no causa ninguna modificación en el contenido en coenzima Q_{9/10}, independientemente de la edad de los animales estudiados (**figura 34, A y C**). La tendencia al descenso en los niveles de coenzima Q₉ con el envejecimiento en las dietas basadas en aceite de soja (*AL-Soy*, *CR-Soy*) no resulta significativa en ninguna de ellas, pero sí lo es ($p < 0,05$) cuando se analiza el efecto de la edad sobre el conjunto de ambas dietas.

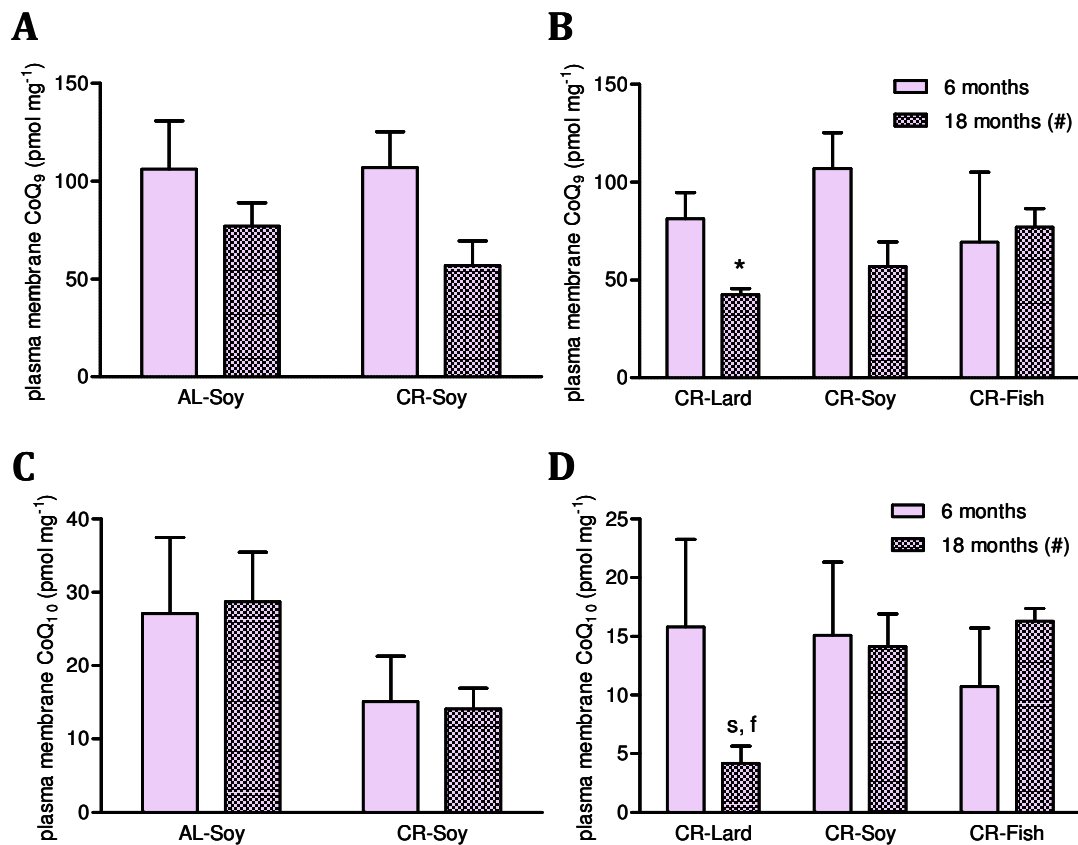


Figura 34. Contenido en coenzima Q₉ y Q₁₀ de la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles de coenzima Q₉ (A, B) y coenzima Q₁₀ (C, D) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente *CR-Lard* a los 6 meses; "s, f", $p < 0,05$ frente a las dietas *CR-Soy* y *CR-Fish* para esa misma edad).

Atendiendo al efecto de los distintos tipos de grasa en las dietas de restricción calórica comprobamos como, aunque no se aprecia ningún efecto en el caso de los animales jóvenes, en los animales con 18 meses de tratamiento existe una tendencia significativa al aumento en la dieta con aceite de pescado, siendo el nivel más bajo el registrado con la de manteca de cerdo. En el caso concreto de la coenzima Q₁₀, el nivel hallado en el grupo *CR-Lard* es un 70%

inferior al obtenido en las otras dietas de restricción calórica. Por otro lado, el único efecto observado del envejecimiento es el descenso en el contenido de coenzima Q₉ en el caso de la dieta que incorpora manteca de cerdo. La misma tendencia se observa en el caso de la coenzima Q₁₀, aunque no es significativa.

Como consecuencia de la similitud en el patrón observado en ambas isoformas y de la predominancia de la coenzima Q₉ en los roedores, la figura que muestra los niveles conjuntos de coenzima Q₉ y Q₁₀ es muy similar a la representación por separado de los primeros (**figura 35**).

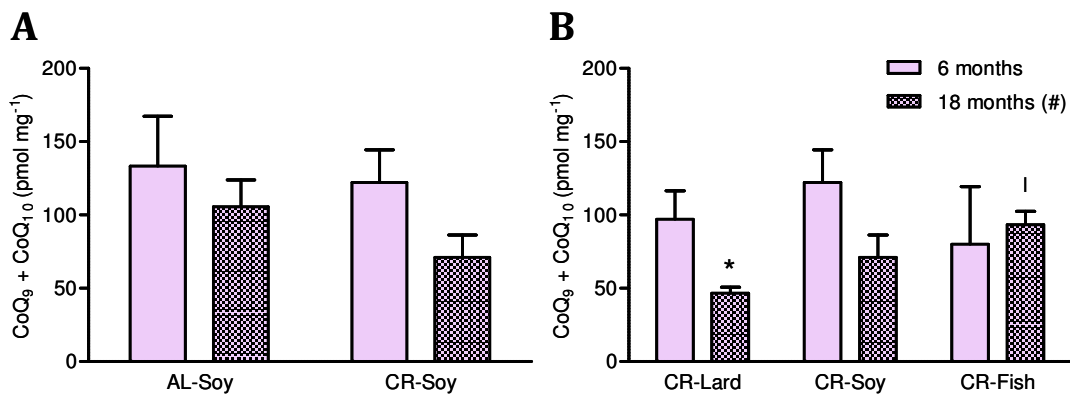


Figura 35. Suma del contenido en coenzima Q₉ y Q₁₀ de la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "I", $p < 0,05$ frente a la dieta CR-Lard para esa misma edad).

Por lo que se refiere a la proporción coenzima Q₉/coenzima Q₁₀ (**figura 36**), la edad provoca un descenso de la ratio si analizamos el conjunto de las dietas AL-Soy y CR-Soy (ANOVA de dos vías, $p = 0,0295$). El aumento de la ratio en los animales viejos sometidos a la dieta CR-Lard no es estadísticamente significativo, no apreciándose más cambios a consecuencia de la edad o la dieta.

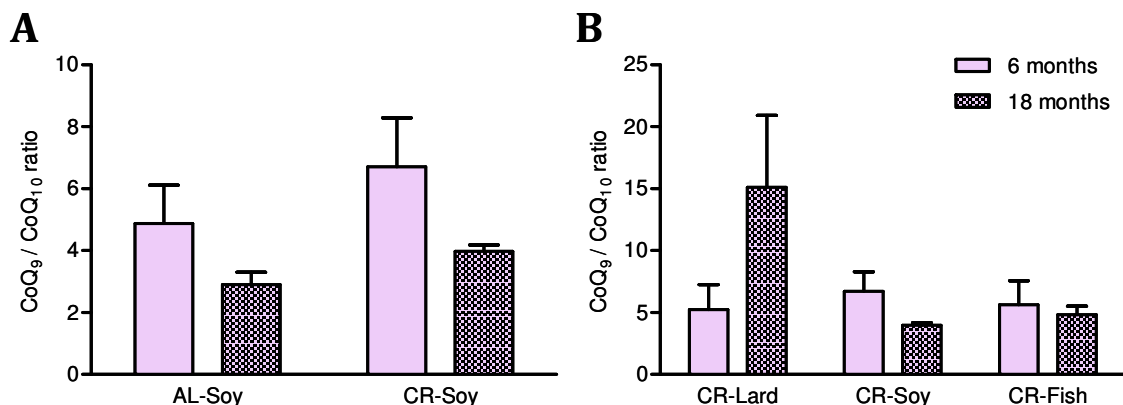


Figura 36. Ratio del contenido en coenzima Q₉ y Q₁₀ de la membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales.

Actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio

La producción de ceramida en la membrana plasmática de hígado aparece fuertemente influenciada por las intervenciones dietéticas utilizadas en el presente trabajo.

En primer lugar, centrándonos en los efectos de la restricción calórica y el envejecimiento, encontramos cómo el envejecimiento ejerce acciones opuestas sobre esta actividad enzimática en función de que se suministre una dieta *ad libitum* o una con calorías limitadas. Mientras que los animales alimentados con la dieta AL-Soy experimentan un aumento de la actividad esfingomielinasa tras 18 meses de tratamiento, aquellos asignados al grupo CR-Soy muestran un descenso en la actividad con respecto a los animales jóvenes (**figura 37**). Asimismo, la CR induce un incremento de la actividad esfingomielinasa en los animales jóvenes mientras que provoca su disminución a los 18 meses de tratamiento con respecto al control *ad libitum*.

El tipo de componente graso de la dieta influye también de manera drástica en la evolución de los niveles de actividad con la edad. En la dieta CR-Lard no hay cambios entre la actividad esfingomielinasa a los 6 y a los 18 meses de tratamiento, al tiempo que los animales alimentados con la dieta CR-Soy sufren el mencionado descenso. En el caso de la dieta CR-Fish observamos una notable actividad en los animales de 18 meses, a un nivel comparable al resto de los grupos, a partir de niveles indetectables de actividad a los 6 meses de dieta.

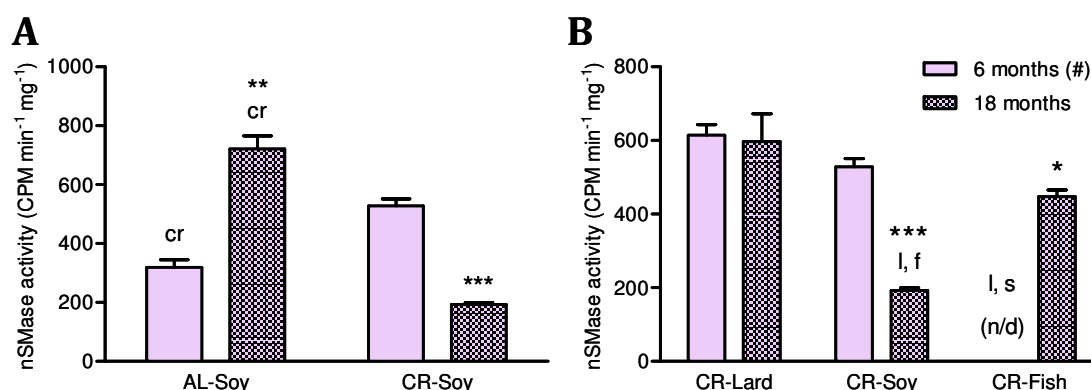


Figura 37. Actividad esfingomielinasa neutra dependiente de magnesio en membrana plasmática de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 3-4 animales (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas de restricción calórica; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica; "l", "s", "f", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-Lard, CR-Soy y CR-Fish, respectivamente, para esa misma edad).

Índice apoptótico

Para contar con una perspectiva general de la intensidad de la apoptosis en el tejido con el que trabajamos, procedimos a analizar el grado de fragmentación del ADN (detección de mono y oligonucleosomas). La medida del índice apoptótico proporciona datos con interesantes variaciones dependientes tanto de la dieta como de la edad. Aparentemente, la restricción calórica no conlleva cambio alguno en este parámetro en ninguna de las edades estudiadas. Sin embargo, en todas las dietas tiene lugar un incremento sustancial y significativo del índice apoptótico con el envejecimiento, salvo en el caso del grupo CR-*Lard*. El índice se duplica en animales del grupo CR-*Fish* y se multiplica por cuatro o cinco en el caso de los animales alimentados con las dietas basadas en aceite de soja tras 18 meses de tratamiento.

Tanto en animales viejos como en los jóvenes, se aprecia una tendencia estadísticamente significativa según la cual la dieta basada en grasa de cerdo presenta valores inferiores con respecto a las otras dos. Esta tendencia es más clara en los animales jóvenes, en los que el índice apoptótico más elevado lo encontramos en la dieta CR-*Fish*.

Cabe destacar, por último, la diferencia en las magnitudes absolutas del índice entre las muestras de hígado y las procedentes de músculo esquelético (**figura 38**). En el caso del hígado, los valores obtenidos fueron muy superiores, tal y como se describe en la literatura [329-330], cerca de unas diez veces más en el caso de los animales jóvenes, factor que se incrementa en el caso del grupo de 18 meses.

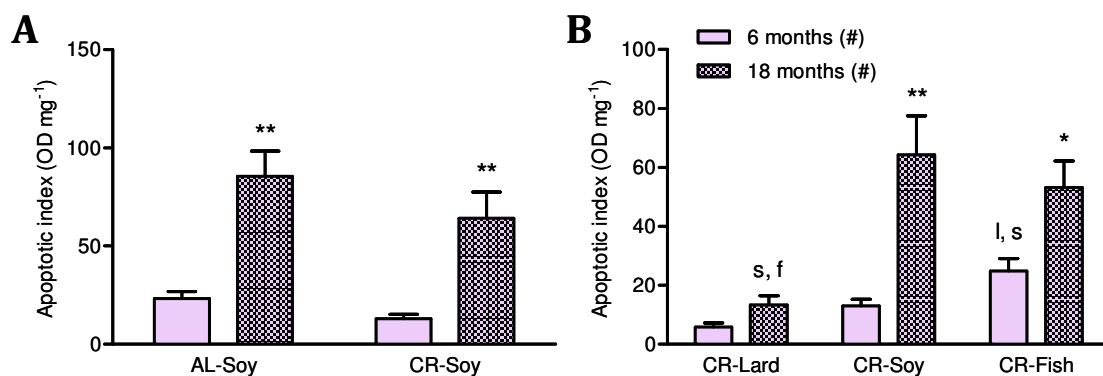


Figura 38. Índice apoptótico en muestras de hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y del origen de la grasa de la dieta (B) tras 6 y 18 meses de tratamiento. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "s, f", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-*Soy* y CR-*Fish* de su misma edad; "l, s", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-*Lard* y CR-*Soy* de su misma edad).

Niveles de proteínas de la familia Bcl-2

Al igual que en las muestras de músculo esquelético, los niveles de proteínas de la familia Bcl-2 fueron estudiados mediante *western blot* en homogeneizados totales.

En la **figura 39 (C)** se muestra el efecto de la restricción calórica y del envejecimiento sobre los niveles del polipéptido Bax. Mediante un ANOVA de dos vías se constata una reducción significativa ($p < 0,01$) de dichos niveles en los animales sometidos a restricción calórica, con respecto a la dieta AL-Soy. En el estudio independiente de los puntos de edad, sólo en los animales jóvenes se aprecia esa diferencia estadísticamente significativa.

La naturaleza del componente graso de la dieta afecta a la evolución de Bax en el envejecimiento (**figura 39, D**). En un contexto de restricción calórica, los animales cuya dieta incorporaba aceite de soja no muestran cambios en los niveles de Bax entre los 6 y los 18 meses de tratamiento. Los correspondientes a la dieta CR-Lard exhiben un incremento aparentemente notable aunque no significativo estadísticamente ($p = 0,09$), mientras que en la dieta CR-Fish sí tiene lugar un claro aumento con la edad.

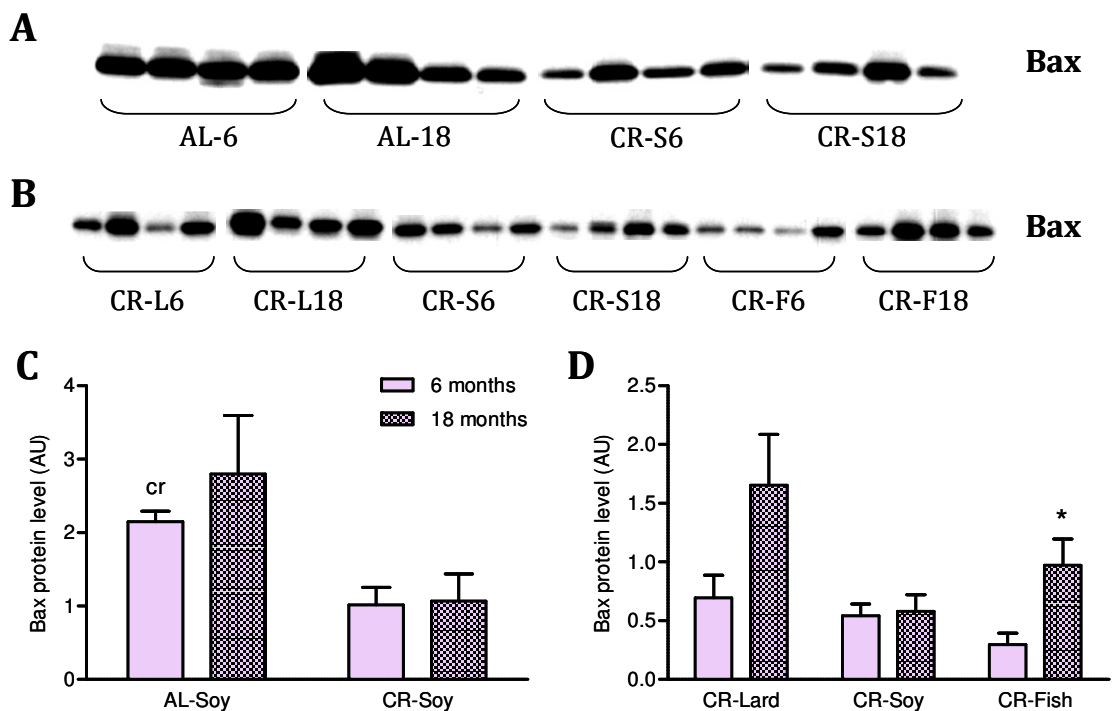


Figura 39. Niveles de Bax en homogeneizados totales de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica).

En el caso de Bcl-2, al contrario que en Bax, la restricción calórica no afecta a los niveles de proteína, pero el envejecimiento sí influye sobre ellos en las dietas que incluyen aceite de soja. Los animales sometidos a 18 meses de tratamiento, tanto *ad libitum* como con la dieta CR-Soy, experimentan un descenso en los niveles de Bcl-2, reduciéndose aproximadamente a una quinta parte (**figura 40**). Este descenso es estadísticamente significativo en el caso de los animales jóvenes ($p < 0,05$) y en el conjunto de los datos de ambas edades ($p < 0,01$).

En el caso del resto de las fuentes de grasa utilizadas, los niveles de Bcl-2 son similares en ambas edades y entre dietas, con la única excepción del mencionado descenso que se produce en los animales alimentados durante 18 meses con la dieta CR-Soy.

Como se mencionó en el caso de algunas de las proteínas estudiadas en músculo esquelético, las ligeras variaciones en los resultados de la comparación de animales jóvenes y viejos de la dieta CR-Soy son debidas a la procedencia de los datos, a partir de geles independientes, por un lado para constatar el efecto de la restricción calórica y el envejecimiento, y por otro para analizar el efecto del origen del componente graso de la dieta junto con la edad.

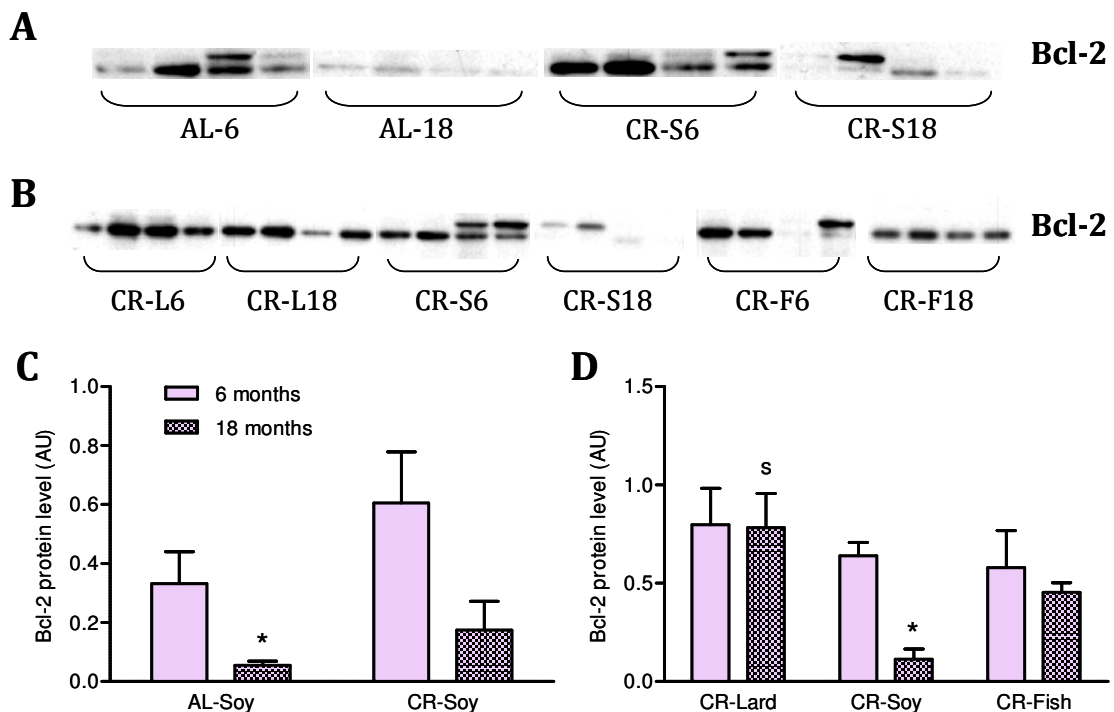


Figura 40. Niveles de Bcl-2 en homogeneizados totales de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "s", $p < 0,05$ frente a la dieta CR-Lard de su misma edad).

Resulta llamativo que, a pesar de la diferente regulación de ambas proteínas en función de la dieta administrada, al calcular la proporción Bcl-2/Bax encontramos en todos los casos una disminución de su valor con el envejecimiento (**figura 41**). Dicha disminución no es estadísticamente significativa en las dietas CR-*Lard* y CR-*Fish*, pero el análisis mediante ANOVA de dos vías nos muestra que la edad es un factor que altera este parámetro ($p < 0,01$).

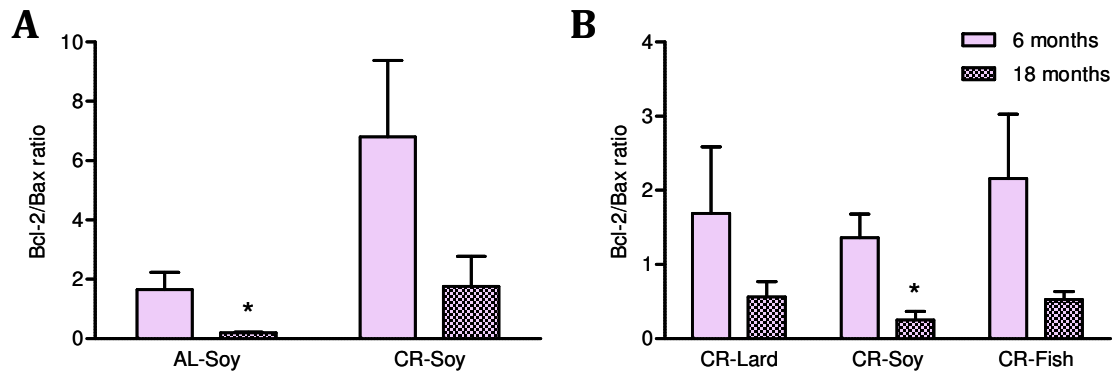


Figura 41. Ratio Bcl-2/Bax en hígado. Efecto de la restricción calórica (A) y el origen de la grasa de la dieta (B). Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento).

Liberación al citosol de AIF y citocromo *c*

La presencia en el citosol de proteínas procedentes del espacio intermembrana de la mitocondria fue medida de forma paralela a como se hizo en el caso del músculo esquelético.

Los niveles citosólicos de citocromo *c* se incrementan con el envejecimiento en todas las dietas estudiadas, sin que se registren cambios como consecuencia de la restricción calórica (**figura 42, C**). Atendiendo al tipo del componente graso de la dieta, vemos cómo en el caso de los animales con 18 meses de tratamiento la cantidad de citocromo *c* presente en el citosol decrece de manera directamente proporcional al descenso de la ratio n-6/n-3 de los ácidos grasos presentes en la dieta. De esta forma, el incremento en los animales viejos alimentados con la dieta CR-*Lard* con respecto a los jóvenes es de más de 15 veces, mientras que en el caso de los grupos CR-*Soy* y CR-*Fish* se multiplica por cuatro.

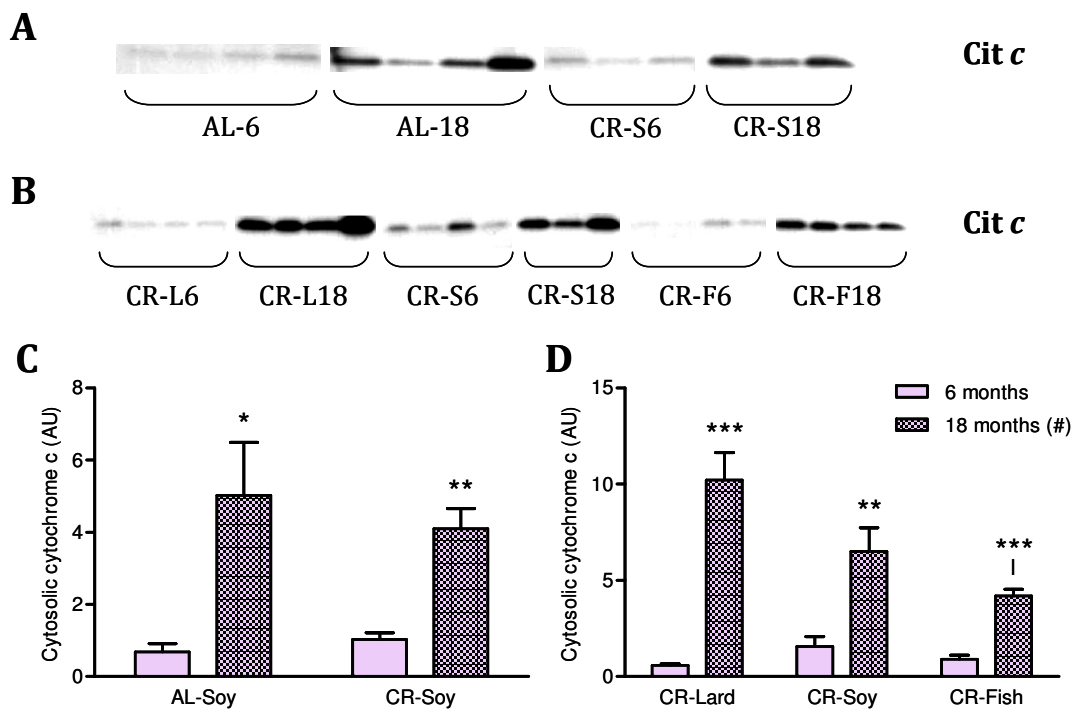


Figura 42. Niveles de citocromo *c* en citosol de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica).

Mientras que los niveles de citocromo *c* se encuentran en línea con lo esperado según el ratio Bcl-2/Bax, la presencia de AIF en el citosol parece seguir un patrón más complejo. En las dietas basadas en aceite de soja se observa una tendencia a la reducción de los niveles citosólicos de AIF, que es significativa en el caso de la dieta CR-Soy (**figura 43, C**). La dieta CR-Fish muestra un comportamiento similar (**figura 43, D**), aunque no alcanza la significación estadística.

No hemos constatado ninguna diferencia entre las distintas fuentes de grasa en el caso de los animales jóvenes. Sin embargo, el descenso de los niveles de AIF citosólicos tras 18 meses de tratamiento en las dietas CR-Fish y CR-Soy provoca que existan diferencias significativas en esta edad con respecto a la dieta CR-Lard, en la que no hay variación alguna entre los 6 y los 18 meses de intervención.

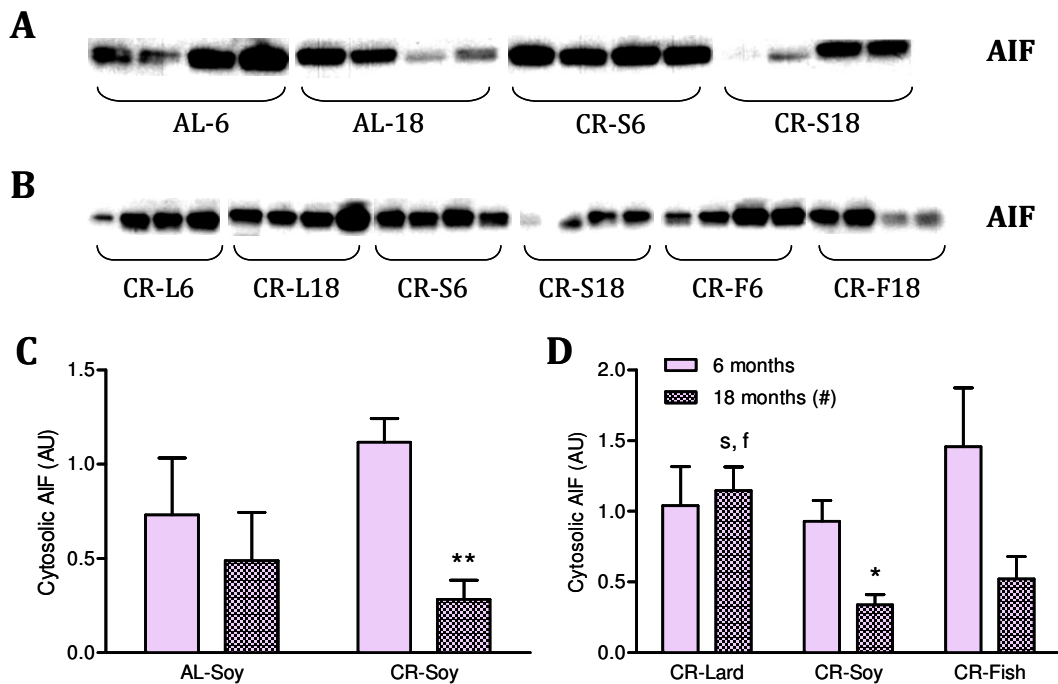


Figura 43. Niveles de AIF en citosol de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "s, f", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-Soy y CR-Fish de su mismo grupo de edad).

Niveles de Hsp70

Para ampliar el espectro de inhibidores de la apoptosis en nuestro estudio, analizamos la presencia en el citosol de la chaperona Hsp70, que ejerce un efecto de contención de los estímulos apoptóticos en diferentes puntos de la cascada de señalización.

Los niveles de la proteína Hsp70 tienden a incrementarse como resultado de una dieta de restricción calórica, tanto en animales jóvenes como en viejos, aunque no existen diferencias significativas en ninguno de los dos casos (**figura 44**). Por el contrario, resultan significativos los incrementos en los animales viejos frente a los jóvenes tanto en el grupo AL-Soy como en el CR-Soy. Tomados ambos grupos conjuntamente, tanto la CR como la edad son fuente significativa de variación (ANOVA de dos vías, $p < 0,05$ para la restricción calórica, $p < 0,01$ para la edad).

En general, entre las distintas dietas CR se observan niveles mayores de Hsp70 en los grupos con menor proporción n-6/n-3 en los ácidos grasos de la dieta. El envejecimiento tiende a atenuar estas diferencias, ya que mientras que en los grupos CR-Lard y CR-Soy se detecta más Hsp70 en los animales viejos ($p = 0,081$ para CR-Lard), en la dieta CR-Fish los niveles se mantiene en el máximo en ambos momentos de la vida de los animales.

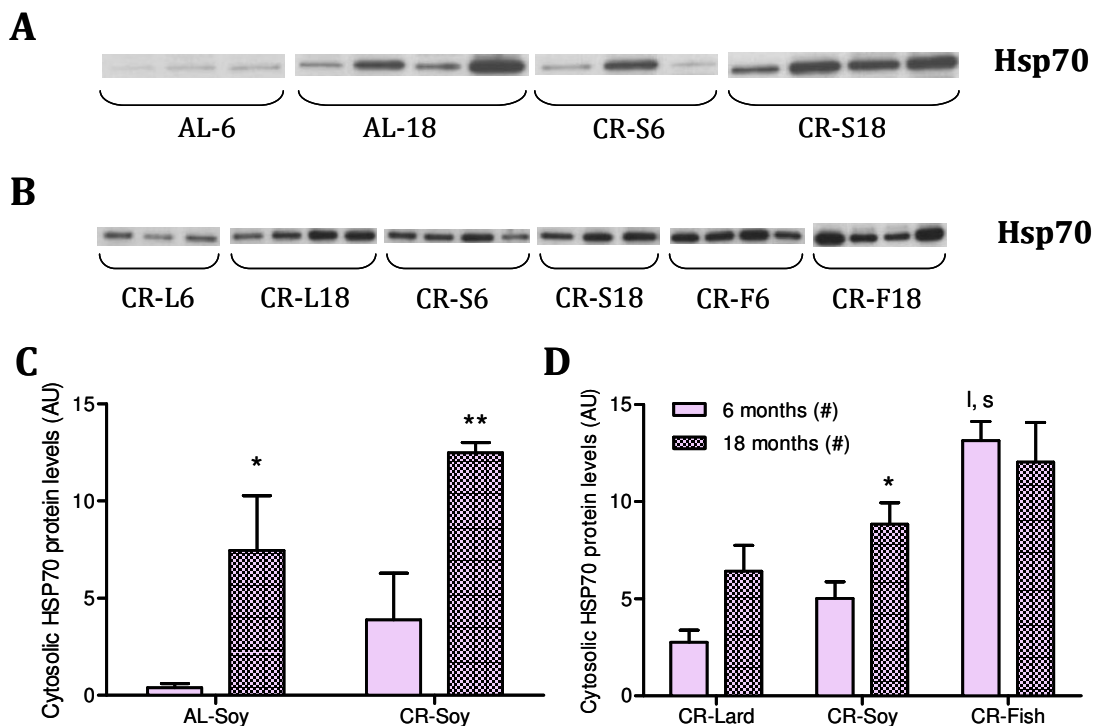


Figura 44. Niveles de Hsp70 en citosol de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento, La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "l, s", $p < 0,05$ frente a las dietas CR-Lard y CR-Soy de su mismo grupo de edad).

Niveles de XIAP

Como se aprecia en la **figura 45**, la edad es la variable que causa una mayor alteración en los niveles del inhibidor de la apoptosis XIAP. En todas las intervenciones dietéticas empleadas, los animales con 18 meses de tratamiento presentan niveles superiores a los de 6 meses, encontrando que únicamente en el caso de la dieta *CR-Fish* las diferencias no son significativas. Los animales viejos del grupo *CR-Lard* presentan unos niveles de XIAP diez veces superiores a los de los animales jóvenes.

Por otro lado, la restricción calórica se asocia a un descenso de los niveles del polipéptido en el caso de los animales viejos, sin observarse este efecto en los jóvenes. A pesar de dicho descenso debido a la restricción calórica, sigue constatándose el mencionado incremento asociado a la edad.

En lo referente al efecto del tipo de componente graso de la dieta, la única variación consiste en unos menores niveles de XIAP en los animales jóvenes con dieta *CR-Lard* frente al grupo *CR-Soy*. No se aprecia influencia del tipo de grasa en el caso de los animales con 18 meses de tratamiento.

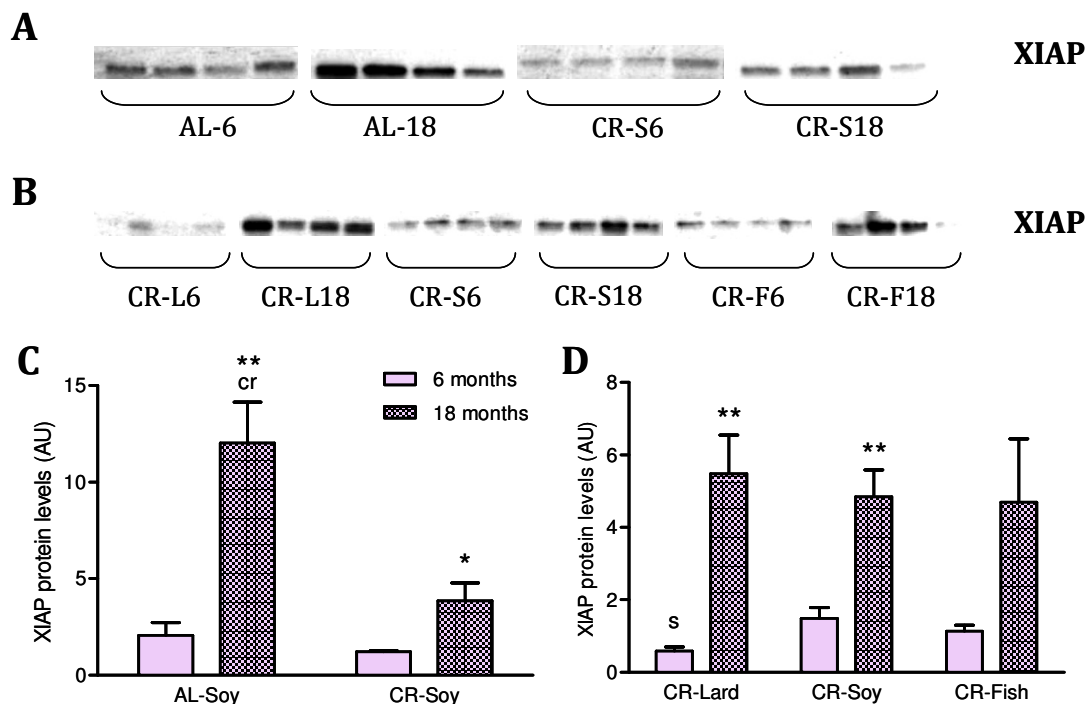


Figura 45. Niveles de XIAP en homogeneizados totales de hígado. Efecto de la restricción calórica (A, C) y del origen de la grasa de la dieta (B, D) sobre los niveles del polipéptido tras 6 y 18 meses de tratamiento. La densidad óptica de las bandas se normalizó usando la tinción con Ponceau S de cada calle. Los resultados se representan como media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica; "s", $p < 0,05$ frente a la dieta *CR-Soy* de su mismo grupo de edad).

Actividades proteasa vinculadas a la apoptosis

La medición de la actividad de las caspasas señalizadoras -8 y -9 mostró un patrón común a ambas, en términos generales. Atendiendo, en primer lugar, al efecto de la restricción calórica, comprobamos cómo a los 6 meses de tratamiento disminuye la actividad de estas caspasas, descenso que no ocurre en el caso de los animales con 18 meses de dieta.

Analizando los datos con una perspectiva más amplia, observamos cómo en los animales alimentados con una dieta *ad libitum* con aceite de soja, la actividad caspasa-8 decrece de manera significativa con la edad (**figura 46**). Sin embargo, los animales sometidos a restricción calórica con este mismo componente graso presentan un incremento de la actividad con el envejecimiento. En el caso de la caspasa-9 no se aprecian diferencias significativas debidas al envejecimiento (**figura 47**), pero la tendencia es similar a la observada en la caspasa-8.

Pasando a estudiar el efecto del origen del componente graso de la dieta, se aprecia en las caspasas señalizadoras, medidas tras 6 meses de intervención dietética, una tendencia descendente siguiendo el patrón CR-Lard > CR-Soy > CR-Fish que venimos observando en numerosos parámetros. En ambas rutas de señalización apoptótica esta tendencia se pierde a los 18 meses de tratamiento (**figuras 46 y 47, B**).

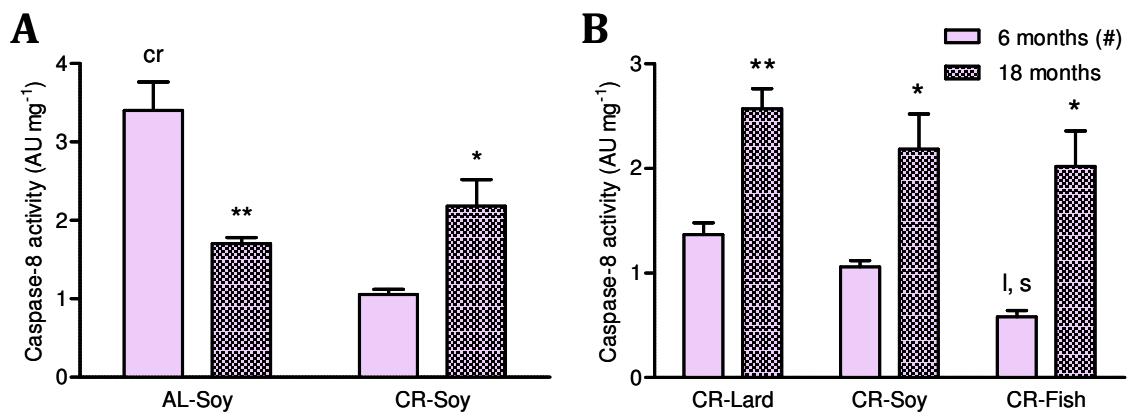


Figura 46. Actividad de la caspasa 8. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ frente a la misma dieta con 6 meses de tratamiento; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "cr", $p < 0,05$ frente a una dieta con restricción calórica; "l, s", $p < 0,05$ frente a las dieta CR-Lard y CR-Soy de su mismo grupo de edad).

Por otro lado, los animales viejos presentan de manera general un incremento en la actividad de estas caspasas, que resulta estadísticamente significativo para la caspasa-8 en todas las dietas de restricción calórica, y para la caspasa-9 en la dieta CR-Fish.

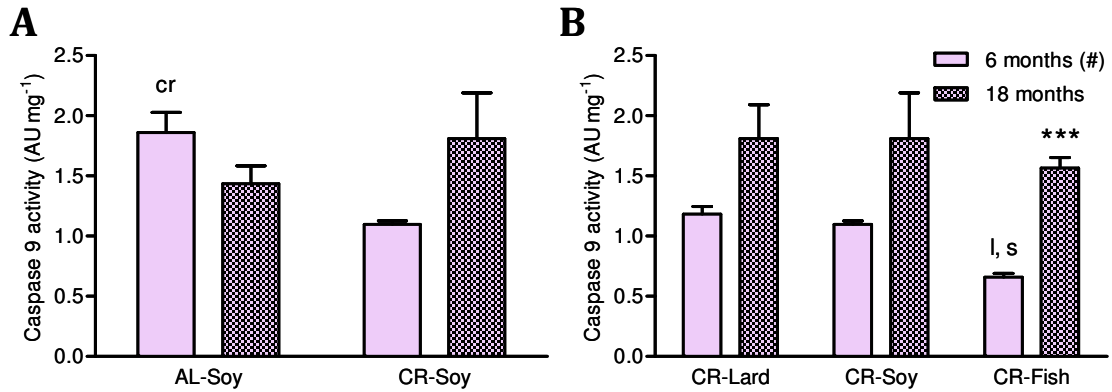


Figura 47. Actividad de la caspasa 9. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (***) $p < 0,001$ frente a CR-Fish a los 6 meses; # $p < 0,05$ para una tendencia lineal entre las tres dietas con restricción calórica; "cr", $p < 0,05$ frente a CR-Soy a los 6 meses; "l, s", $p < 0,05$ frente a CR-Lard y CR-Soy a los 6 meses).

Como ocurre también en los análisis efectuados en músculo esquelético, la caspasa-3 reacciona a las intervenciones dietéticas de una manera diferente a como lo hacen las caspasas señalizadoras. Con respecto al control *ad libitum* de 6 meses se constata un descenso de la actividad caspasa-3 tanto en los animales de la misma dieta a los 18 meses de tratamiento, como en los animales de 6 meses sometidos a restricción calórica. Este comportamiento es análogo al observado en la caspasa-8. No obstante, el efecto del envejecimiento en la dieta de restricción calórica con aceite de soja es nuevamente un descenso de actividad, al contrario de lo observado en el resto de caspasas. No se observa efecto de la restricción calórica en los animales tratados durante 18 meses.

Como se muestra en la **figura 48 (B)**, no hay ninguna influencia del componente graso de la dieta sobre la actividad de la caspasa-3 en condiciones de restricción calórica, como tampoco influye el envejecimiento en el caso de las dietas CR-Lard y CR-Fish. El único cambio observado es el ya mencionado descenso de la actividad en los animales viejos del grupo dietético CR-Soy con respecto a sus equivalentes con 6 meses de tratamiento.

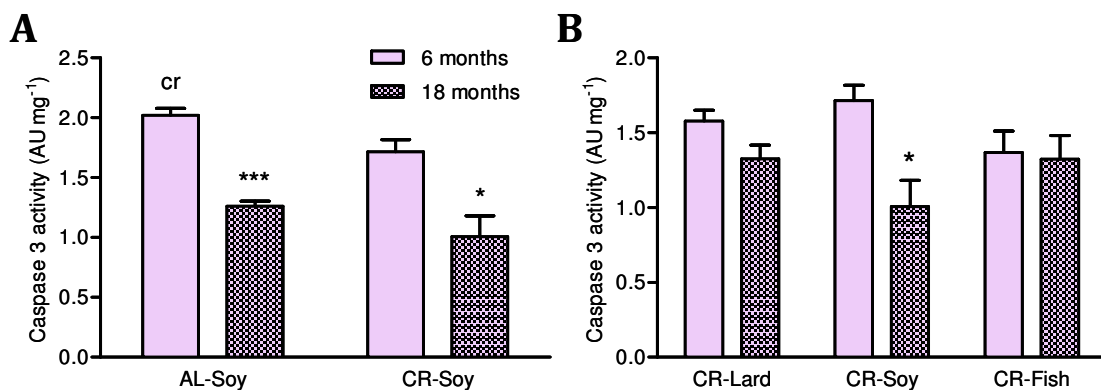


Figura 48. Actividad de la caspasa 3. Los resultados se representan como la media \pm SEM de 4 animales (***) $p < 0,001$ frente a AL-Soy tras 6 meses; * $p < 0,05$ frente a CR-Soy 6 meses; "cr", $p < 0,05$ frente a CR-Soy 6 meses).

DISCUSIÓN

Efectos de las intervenciones dietéticas sobre la señalización apoptótica en el músculo

Los procesos de degeneración muscular por apoptosis, en ausencia de otros factores o enfermedades que contribuyan a su aceleración, tienen lugar principalmente como consecuencia del envejecimiento. En el presente estudio se han analizado, además, los efectos de dos variables más: la restricción calórica y el origen del componente lipídico de la dieta. Mientras que numerosos trabajos se han llevado a cabo para estudiar la reversión por la restricción calórica de los efectos degenerativos del envejecimiento sobre el músculo, atendiendo concretamente a marcadores de diferentes rutas de la apoptosis, la influencia de las características del componente graso de la dieta no ha sido estudiada en profundidad.

Restricción calórica y señalización apoptótica en animales jóvenes

El efecto de la restricción calórica sobre la degeneración del músculo esquelético vinculada al envejecimiento ha sido estudiado con anterioridad [331-332], existiendo un consenso en torno a la idea de que la CR es capaz de atenuar dicha degeneración. Varios autores, además, han investigado el efecto de la CR sobre diversos marcadores relacionados con la apoptosis, estableciendo que animales viejos alimentados en condiciones de restricción calórica presentan niveles menores o, en todo caso, invariables de indicadores como la actividad de varias caspasas, la apoptosis independiente de caspasas y la fragmentación del ADN, en comparación con animales viejos alimentados *ad libitum* [289-290, 296]. Sin embargo, faltan en la literatura datos acerca del efecto de la CR sobre animales jóvenes, en los que podríamos comprobar los efectos de dicha dieta en ausencia de un cuadro patológico.

De acuerdo con nuestros datos, después de 6 meses de restricción calórica (a los 9-10 meses de edad) se produce un descenso en los niveles de la proteína proapoptótica Bax, mientras que los de Bcl-2 permanecen invariables. Un aumento de los niveles de Bax no indica *per se* una mayor desestabilización de la membrana externa mitocondrial. Sin embargo, la presencia de citocromo *c* y AIF en el citosol se ve reducida, como cabría esperar en un tejido muscular con menor presencia de mitocondrias sometidas a la liberación del contenido del espacio intermembrana de la mitocondria. La actividad esfingomielinasa neutra ligada a la membrana plasmática también desciende, indicando una menor liberación de ceramidas capaces de inducir apoptosis. Observamos un descenso en los niveles de XIAP, en línea con lo descrito en la literatura en el caso de animales viejos [289]. Sin embargo, la actividad de las

caspasas iniciadoras -8 y -9, la de la caspasa-3 y el índice apoptótico permanecieron inalterados.

Estos resultados se corresponden con lo observado en ratas de 24 y 26 meses de edad en lo que se refiere a la actividad de las caspasas -9 y -3. En este último caso, se ha encontrado una discrepancia entre los niveles de caspasa-3 procesada, que decrecen como consecuencia de la restricción calórica, y la actividad de la proteasa medida mediante ensayo fluorimétrico, que permanece invariable [289]. Consideramos que es ésta última determinación la que indica con mayor fidelidad la actividad fisiológica de la caspasa-3.

Tenemos constancia de un único trabajo anterior que midiera los niveles de Bax y Bcl-2 en ratas jóvenes sometidas a restricción calórica, y no se observaron diferencias significativas [333]. Por otro lado, la mayor parte de los efectos de la restricción calórica pueden ser reproducidos sometiendo a los animales a ejercicio físico [292], y se dispone de observaciones parciales a muy corto plazo que indican que dicho ejercicio incrementa la apoptosis muscular de forma inmediata con intervención de las proteínas de la familia Bcl-2. Este efecto se revierte en el plazo de algunos días con un mecanismo similar a una adaptación, hasta quedar por debajo de los niveles iniciales, con un incremento de Bcl-2 y una disminución de Bax [334-335]. Nuestros datos para ratones jóvenes tras 6 meses de CR apuntan en esta dirección, aunque sin observarse cambios en Bcl-2, como ya se ha mencionado.

La diferencia más relevante entre nuestros datos tomados en animales jóvenes y los trabajos citados, que estudian animales viejos, la encontramos en el índice apoptótico, o medida de la fragmentación del ADN como consecuencia, principalmente, de procesos de muerte celular programada. Se ha comprobado cómo la CR previene parcialmente el incremento en el índice apoptótico que se produce en ratas de 24-26 meses con una dieta *ad libitum*. Si bien sería razonable argumentar que en animales jóvenes no tiene por qué observarse aún este efecto de atenuación, nuestros datos indican que tampoco en ratones sometidos a 18 meses de restricción calórica (21 meses de edad) se reproducen estas observaciones. Más adelante se analizarán detenidamente estos resultados.

Cabe señalar, por último, un sutil pero interesante efecto de la CR sobre el perfil de ácidos grasos del sarcolema, ya que la única variación como consecuencia de esta dieta es la disminución en la presencia de ácidos grasos altamente insaturados (3 o más dobles enlaces), los HUFAs, debida al descenso en la cantidad de los ácidos grasos 22:5 n-3 y 22:6 n-3 (DHA). Como se explicó en el apartado de Introducción, se ha demostrado que la restricción calórica actúa reduciendo el grado de insaturación de las membranas celulares, que se puede medir

usando el índice de dobles enlaces (DBI). En nuestro estudio, encontraremos un descenso similar, si bien no significativo, en la membrana plasmática de hepatocitos de ratones viejos.

Efecto de la grasa de la dieta en animales jóvenes

La introducción de diversas fuentes de grasa en la dietas CR también produjo importantes variaciones en los marcadores de señalización apoptótica del músculo esquelético. Tal y como se ha expuesto, se observa en la mayor parte de ellos una tendencia coincidente con la proporción de ácidos grasos n-6/n-3 en la dieta. Es importante indicar que dicha proporción, de acuerdo con nuestros análisis de composición de ácidos grasos, se conserva en el caso de los ácidos grasos del sarcolema, de manera que existe una tendencia significativa desde un máximo en la ratio n-6/n-3 para la dieta CR-*Lard*, hasta un mínimo en la dieta CR-*Fish*, encontrando en CR-*Soy* un valor intermedio.

Estudios anteriores sugieren que una restricción calórica de entre el 15% y el 30% diluye los efectos de la introducción de diferentes fuentes de grasa en la dieta, por lo que respecta a la composición de la membrana plasmática [336]. Atendiendo al elevado grado de saturación detectado en la membrana plasmática, el mencionado artículo detecta entre un 56% y un 86% de ácidos grasos saturados en los fosfolípidos de dicha membrana, dependiendo del tipo de fosfolípidos y de la dieta empleada. Otros autores observan, en membranas plasmáticas extraídas mediante el método de doble fase, una casi total ausencia de ácidos grasos poliinsaturados en las moléculas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina [404]. En nuestro trabajo, observamos cómo el componente graso afecta, en una situación de restricción calórica del 40%, a la composición de la membrana plasmática y, en especial, al contenido de ésta en los diversos tipos de PUFA, así como a un amplio espectro de marcadores relacionados con los procesos de muerte celular.

En primer lugar, y atendiendo a los parámetros correspondientes a la membrana plasmática, detectamos un incremento en la concentración de coenzima Q, tanto Q₉ como Q₁₀ (cuyos niveles se triplican) en las muestras del grupo CR-*Fish* frente a los otros dos tipos de grasa. La coenzima Q es un antioxidante que actúa tanto en la membrana mitocondrial interna como en la membrana plasmática, y este aumento podría ser una respuesta frente a un ambiente más prooxidante propiciado por la mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, la coincidencia con la abundancia de PUFA en el sarcolema es sólo aproximada. Esta relación entre ambos parámetros es más clara si se tienen en cuenta únicamente los ácidos grasos con más dobles enlaces (cinco y seis, en su mayoría de la serie n-3), al comparar su presencia en el sarcolema con la abundancia de coenzima Q₉, la isoforma

más frecuente en roedores, mientras que la suma de ambas isoformas sigue un patrón muy similar. La coenzima Q es capaz de inhibir la actividad esfingomielinasa neutra asociada a la membrana plasmática [250] y, de acuerdo con ello, en nuestros resultados se observa un descenso significativo de dicha actividad en la dieta *CR-Fish*. La consecuente disminución en la producción de ceramida puede atenuar la señalización proapoptótica en determinadas rutas de muerte celular.

En la misma línea, los niveles de la proteína Bax descienden de manera muy notable (en un 90%) en la dieta que incorpora aceite de pescado. La proteína Bcl-2 permanece invariable, pero la ratio Bcl-2/Bax aumenta, en relación inversa con la proporción n-6/n-3 en los ácidos grasos de la dieta y del sarcolema. La disminución de la cantidad de Bax disponible en la célula para reaccionar ante ciertos estímulos activando procesos de muerte celular indica, en cierto modo, una predisposición de la célula a evitar la entrada en apoptosis. No hemos podido detectar, sin embargo, cambios en la liberación de citocromo *c* al citosol entre las dietas con diferentes fuentes de grasa, al contrario de lo observado en el caso de la restricción calórica, donde sí se apreciaba un descenso.

La actividad de las caspasas iniciadoras o señalizadoras, -8 y -9, es mayor en el grupo *CR-Lard* que en *CR-Soy* y en *CR-Fish*, mostrando este último grupo el menor nivel entre las tres variantes dietéticas. Estos cambios no se transmiten más allá en la cascada de señalización apoptótica, de manera que ni la caspasa-3 ni el índice apoptótico varían en las condiciones experimentales estudiadas. La presencia de AIF en el citosol tampoco se ve alterada. Los cambios en la actividad de la caspasa-9, además, no encuentran correspondencia en los niveles citosólicos de citocromo *c*, ni se explican por una disminución de la inhibición debida a XIAP. Cabe suponer que están actuando otros mecanismos adicionales de regulación del apoptosoma, que pueden ir desde la regulación de la expresión de Apaf-1 hasta la intervención de chaperonas, entre otros.

La ausencia de cambios en la caspasa-3 y el índice apoptótico, requiere una doble lectura. Por un lado, la alteración en los demás pasos de la señalización apoptótica es relevante de por sí, ya que está determinando la capacidad de la célula para responder a estímulos puntuales dirigidos a promover la muerte celular. En trabajos anteriores se ha esbozado la idea acerca de la existencia de un ambiente o entorno intracelular más o menos propenso a la apoptosis, con independencia de si la señalización se transmite finalmente o no a los efectores [302]. Por otra parte, sin embargo, el margen de error de los ensayos podría estar enmascarando efectos más sutiles.

Un análisis por microscopía electrónica del músculo gastrocnemio de los animales sometidos a 6 meses de intervención dietética, llevado a cabo de forma paralela en nuestro

grupo de investigación y recientemente publicado, reveló un aumento del área de las fibras musculares en corte transversal, y por lo tanto un descenso de la circularidad de las mismas, como consecuencia de una dieta de restricción calórica [337]. Ambos parámetros se encuentran relacionados a través de una disposición más laxa de las fibras musculares dentro de los fascículos musculares debido a una disminución de su área transversal, lo que favorece la pérdida de una apariencia poliédrica a favor de una más redondeada con el envejecimiento.

Estos resultados son compatibles con una disminución de la apoptosis mionuclear, y por tanto con el mencionado “entorno” antiapoptótico detectado en la dieta RC-*Soy* con respecto al grupo AL-*Soy*. La correlación también existe en el caso de la comparación entre dietas con diferente origen del componente graso de la dieta: en consonancia nuevamente con los demás parámetros estudiados, la circularidad de las fibras es mayor (y el área de la sección, menor) en la dieta CR-*Lard* que en la dieta CR-*Fish*.

Cabe objetar que, con la única excepción del descenso en los niveles citosólicos de AIF, no hay cambios en los efectores estudiados (el propio AIF y caspasa-3), ni tampoco en la cuantificación de la fragmentación del ADN, que respalden la relación de la apoptosis con los cambios ultraestructurales. Sin embargo, la sensibilidad del análisis por microscopía es mucho mayor, ya que los cambios detectados son del orden del 3% en el coeficiente de circularidad, y de entorno al 7% en el área transversal. Es razonable que dichos cambios no hayan sido detectados en los análisis por inmunodetección y ensayos fluorimétricos, y que sean efectivamente la expresión de las tendencias indicadas por los demás parámetros estudiados.

La influencia de los diferentes tipos de ácidos grasos sobre la apoptosis, aunque no bajo condiciones de restricción calórica, ha sido objeto de estudio anteriormente, también en el caso de tejidos con escasa capacidad de regeneración como son los tejidos muscular y nervioso.

En el tejido nervioso, se han investigado los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6 sobre la degeneración neuronal y sobre la recuperación tras lesiones de médula espinal. En el caso de las lesiones medulares, se ha demostrado que el tratamiento con ácido araquidónico con posterioridad al daño aumenta la gravedad de la lesión y la tasa de apoptosis en el área de la misma, mientras que ácidos grasos n-3 como el ácido docosahexaenoico tienen el efecto contrario [338]. La expresión del gen *fat-1* de *Caenorhabditis elegans*, que codifica una desaturasa n-3, en neuronas corticales de ratas provocó una disminución de la ratio n-6/n-3 en los ácidos grasos presentes en las membranas

celulares, así como la inhibición de la muerte celular provocada por retirada de suero en los cultivos primarios, mostrándose un incremento de la viabilidad [339].

En lo referente al músculo esquelético, algunos estudios han mostrado cómo ácidos grasos saturados libres, como el palmitato, son capaces de incrementar la actividad de la caspasa-3 y la señalización proinflamatoria en modelos celulares de músculo, en comparación con los efectos de ácidos grasos insaturados como el oleico [340] o diversos PUFA [341]. De la serie n-3, es probablemente el ácido eicosapentaenoico (EPA) el que ha sido objeto de más trabajos al respecto. Pretratamientos con EPA contribuyeron a disminuir la intensidad de la apoptosis inducida por TNF- α en miotubos obtenidos de la línea C2C12, además de proteger a las células frente a la interrupción de su diferenciación [342]. La suplementación con EPA atenuó la progresión de la caquexia en pacientes con cáncer pancreático avanzado [343], un efecto que se ha relacionado con la regulación del sistema ubiquitina-proteasoma [344]. Como el resto de los ácidos grasos de la serie n-3, además de contribuir a disminuir la señalización proinflamatoria, el EPA podría actuar directamente inhibiendo la activación de NF- κ B, mientras que ácidos grasos de la serie n-6 estimulan dicha activación (revisado en [342]).

Los perfiles de ácidos grasos obtenidos en nuestro estudio reflejan una incorporación de los ácidos grasos de las series n-6 y n-3 al sarcolema de manera proporcional a su abundancia en la dieta. En el caso del EPA y el DHA, los dos ácidos grasos de la serie n-3 con una mayor actividad biológica, la suma de sus respectivos porcentajes de abundancia supone aproximadamente el doble en la dieta CR-*Fish* con respecto a los animales con dietas CR-*Lard* o CR-*Soy*, en una tendencia opuesta a la del ácido araquidónico. Estos datos, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados sobre la influencia de los PUFA sobre el músculo esquelético, son compatibles con una actuación de los ácidos grasos n-3 dirigida a crear en la fibra muscular un estado ligero pero significativamente más refractario a los estímulos apoptóticos cuanto menor sea el ratio n-6/n-3.

La previsible ausencia de afecciones graves que comprometan la homeostasis del órgano al tratarse de animales jóvenes justifica la ausencia, o presencia sutil y en todo caso de poco impacto en la fisiología muscular, de efectos detectables en cuanto a la terminación del proceso de apoptosis mionuclear.

Apoptosis muscular y envejecimiento en una dieta *ad libitum* con aceite de soja

Mientras los resultados obtenidos después de 6 meses de intervenciones dietéticas muestran un patrón razonablemente ajustado a lo descrito en la literatura (en el caso de la restricción calórica estudiada de forma aislada) y a lo esperable debido a los conocidos efectos de los PUFA sobre el músculo esquelético (en lo referente a los distintos tipos de grasa), la visión de conjunto de los resultados a partir de animales sometidos a 18 meses de experimentación son contrarios tanto a los datos disponibles sobre CR y envejecimiento, como a la idea de que los efectos beneficiosos de la dieta CR-*Fish* pudieran hacerse más notorios en los animales viejos.

Al tener los ratones 10 semanas de vida cuando se iniciaron las intervenciones dietéticas, los animales de esta segunda fase del trabajo fueron sacrificados a los 21 meses de edad tras 18 meses de intervención dietética. Los ratones jóvenes, por su parte, fueron sacrificados aproximadamente a los 9 meses de edad, tras 6 meses de intervención dietética.

Los efectos del envejecimiento sobre la apoptosis en el músculo esquelético han sido previamente estudiados especialmente en ratas, dado que su tamaño facilita el estudio individualizado de diferentes músculos con características propias. Así, se han descrito variaciones en la práctica totalidad de los parámetros relacionados con las rutas de apoptosis, y el consenso generalizado describe un incremento de la muerte celular programada, que se detecta a partir de 24-26 meses de edad, en comparación con animales jóvenes de 6-8 meses (revisado en [297]).

En contraste con estos resultados previos, nuestras medidas del índice apoptótico en animales jóvenes y viejos no muestran ninguna diferencia debida a la edad o la dieta. Son numerosos los trabajos anteriores que encuentran un aumento en este parámetro con la edad, entorno al 50-60% [288, 296, 301, 303], con aumentos aún mayores en animales de 29 y 37 meses de edad [216]. Sin embargo, el efecto de la edad sobre las diferentes rutas responsables de este aumento en la presencia de mionúcleos apoptóticos no se encuentra esclarecido del todo, y una observación en profundidad de los estudios realizados sobre el tema muestra importantes puntos de debate.

Varios trabajos coinciden en encontrar un incremento en la fragmentación del ADN sin que se produzca un aumento en la actividad de la caspasa-3 o en la presencia de su forma procesada [288, 291], o con cambios no totalmente concluyentes [303], mientras que en otros se muestra una correlación entre la caspasa-3 madura y la fragmentación del ADN, sin medirse la actividad [294]. En nuestro caso, no observamos cambios en la actividad de la

caspasa-3. Existe una ligera tendencia al aumento en animales viejos, que se confirma en otras dietas, pero no se trata de un cambio significativo ni cercano a serlo.

La ausencia de cambios en la concentración citosólica de citocromo *c* que se observa en nuestros resultados coincide con lo descrito en diversos trabajos anteriores [216, 288, 291], aunque entra en contradicción con lo publicado en al menos otro artículo en el que se menciona un incremento del contenido citosólico de citocromo *c* con la edad [303] y con un último en el que se registra una disminución de los niveles de este marcador [289], investigaciones todas ellas realizadas empleando músculo gastrocnemio de rata.

En estrecha relación con la presencia de citocromo *c* en el citosol, también han sido estudiadas anteriormente las proteínas Bcl-2 y Bax para comprobar su evolución con el envejecimiento en el músculo esquelético, ofreciendo de nuevo resultados contradictorios. En músculo gastrocnemio se ha observado: una ausencia de cambios con el envejecimiento en los niveles de ambas proteínas en la mitocondria [288], un aumento de los niveles celulares de Bax en mayor medida que de Bcl-2 (disminuyendo, por lo tanto, la ratio Bcl-2/Bax) [291], y un aumento en similar medida de los niveles mitocondriales de Bax y Bcl-2, aunque sólo en animales muy viejos, de 37 meses, mientras que no había diferencias apreciables a los 29 meses y la ratio Bcl-2/Bax, pese a descender, nunca varió significativamente [216]. Aumentos de este tipo (sin alterar la proporción entre ambas proteínas) en los niveles de Bcl-2 y Bax también han sido registrados [303].

En el músculo *plantaris* de ratas FBN de 9 y 33 meses de edad se ha descrito un incremento de los niveles de las proteínas Bax y Bcl-2, en similar proporción para ambas [302]. En dicho estudio la expresión del gen *Bax* aumentaba en las ratas viejas más de lo que lo hacía la de *Bcl-2*, sin que esto pareciera reflejarse en los niveles de proteína. Sin embargo, otro estudio llevado a cabo el mismo año en ratas FBN de 9, 30 y 35 meses de edad, utilizando también el músculo *plantaris*, registró descensos muy acusados en la expresión de *Bax* y de *Bcl-2* en animales viejos [304].

Nuestros datos reflejan una ausencia de cambios en los niveles de proteína Bax en los ratones AL-Soy de 21 meses frente a los de 9 meses, así como una ligera tendencia al descenso de los niveles de Bcl-2. Como consecuencia, la proporción Bcl-2/Bax tiende a decrecer, pero las diferencias no son significativas estadísticamente. Conviene tener en cuenta que la proporción entre estas dos proteínas es un indicador que en ocasiones pierde valor cuando se prueba la intervención de otros agentes. La presencia de Bid en las mitocondrias del músculo gastrocnemio de ratas viejas, por ejemplo, aumenta la señalización apoptótica sin que se pueda detectar cambio alguno en Bax o en Bcl-2 [216].

Numerosos trabajos han medido la evolución de la caspasa-9 con la edad en el músculo. Dirks y Leeuwenburgh no observaron cambios con el envejecimiento en el grado de procesamiento de la procaspasa-9 (formación de caspasa-9 madura) [289], nuevos datos mostraron un ligero incremento en el procesamiento de la caspasa-9 en ratas viejas (que desaparecía al avanzar aún más su edad) [216], mientras que un trabajo más reciente del mismo grupo encuentra un aumento en el envejecimiento y correlación entre las caspasas -3 y -9 y el índice apoptótico [296]. Incrementos en la actividad o el procesamiento de la caspasa-9 han sido mostrados también por otros grupos [291, 303]. Por otro lado, diferentes grupos trabajando sobre músculo *plantaris* apuntan a un aumento de la expresión génica para la caspasa-9 [304] o a una ausencia de cambios con el envejecimiento [302]. La caspasa-8, debido a su papel menos central en la apoptosis, ha sido objeto de menos investigación. Hay datos sobre un incremento moderado de su actividad y expresión en *plantaris*, aumento o ausencia de cambios en sóleo, e incremento de su procesamiento en el *extensor digitalis longus* [345].

En ninguna de estas dos caspasas iniciadoras hemos podido observar un aumento de la actividad vinculado al envejecimiento. Como se comentó anteriormente, hemos prescindido de las medidas por *western blot* de los fragmentos procesados de las caspasas, por considerar que el ensayo fluorimétrico era más representativo de la situación fisiológica real.

Tampoco pudimos constatar cambio alguno en los niveles de XIAP como resultado del envejecimiento, en contraste con el aumento del 30-50% detectado en los pocos trabajos que han medido este parámetro [289, 303]. El papel de XIAP en las fibras musculares no está aún del todo esclarecido. Aunque se ha sugerido que las fibras musculares esqueléticas pueden funcionar como células tipo II en lo que a señalización apoptótica se refiere [346], se desconoce la importancia concreta de XIAP en este tipo celular.

Ante la imposibilidad de establecer de forma unívoca una ruta responsable de la apoptosis en el músculo esquelético con el envejecimiento, algunos estudios sugieren que la intervención de las rutas clásicas dependientes de caspasas en la muerte de los mionucleos es residual, y que la mayor parte de la actividad de muerte celular recae sobre la apoptosis independiente de caspasas dirigida, principalmente, por AIF, marcador para el que se ha descrito un aumento de niveles de proteína total (aunque sin elevación de su presencia en el núcleo) [289] y citosólica [216]. Son varios los trabajos, sin embargo, en los que no se detecta ninguna variación de AIF a nivel de expresión [302] o mediante *western blot* sobre muestras de homogeneizado total de gastrocnemio [291] y fracciones citosólicas del mismo músculo [303] y de otros [293]. En esta última línea se encuentran nuestros datos.

Diversas explicaciones resultan plausibles para interpretar nuestros datos en particular y para el debate en torno a las rutas implicadas, en general. Algunos de los trabajos en los que se observa más claramente un incremento de la apoptosis muscular, con correlación de la mayor parte de los parámetros implicados, muestran datos correspondientes a edades muy avanzadas, con ratas de 29 y 37 meses, en algunos casos. La aparición de degradación apoptótica de fibras musculares podría suceder en etapas muy tardías de la vida, y animales adultos viejos pero sacrificados considerablemente antes de la longevidad media de la población (10 meses frente a unos 26-27, en el caso de la dieta AL-Soy). Se han encontrado aumentos en algunos marcadores relacionados con apoptosis (inactivación de Bcl-2, detección de núcleos apoptóticos) en ratones a los 25 meses, aproximadamente (revisado en [297]).

Por otro lado, aunque no exista una explicación clara del funcionamiento de la cascada de señalización, es clara la tendencia al incremento de los diferentes marcadores estudiados con la edad, en los trabajos citados. Uno de los parámetros cuyo resultado es más repetitivo es la detección de ADN fragmentado o índice apoptótico. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la dificultad de determinar si dichos núcleos apoptóticos son realmente mionúcleos de las fibras musculares o pertenecen a algún otro tipo celular, especialmente a células satélite [289, 347]. No se conoce suficientemente la señalización de la apoptosis mionuclear, pero aún más desconocidas son su dinámica, duración y consecuencias para el conjunto de la fibra muscular, aunque se ha comprobado que existe una asociación con el sistema del proteasoma, degradándose un sector de la fibra tras la desintegración del mionúcleo [348].

De este modo, aunque parece claro un incremento de la actividad de los mecanismos implicados en la muerte celular programada en el envejecimiento, la descripción detallada del funcionamiento de dichos mecanismos en el músculo esquelético aún no está concluida.

Efecto de la restricción calórica sobre los cambios debidos al envejecimiento

Tal y como se ha expuesto en la Introducción, la restricción calórica no sólo extiende la longevidad, sino que retrasa la aparición de diversas enfermedades vinculadas al envejecimiento. En el caso del músculo esquelético, varios grupos de investigación han abordado los efectos de la CR sobre la pérdida de masa muscular asociada al envejecimiento, encontrando que se revierte tanto la degeneración del músculo como el incremento de diversos marcadores vinculados a la apoptosis [289-290, 331, 349]. Se ha observado

repetidamente que el índice apoptótico decrece en los animales viejos sometidos a restricción calórica frente a los grupos control [289, 294, 296]

La ausencia de cambios relevantes debidos al envejecimiento en nuestros datos dificulta la observación de este tipo de efectos debidos a la restricción calórica. Hemos constatado como en los animales viejos se atenúan varios de los cambios observados en los ratones jóvenes como consecuencia de la CR, como ocurre con el descenso en los niveles citosólicos de AIF y citocromo *c*, y en los niveles totales de XIAP. Se mantiene la tendencia a disminuir la cantidad de Bax, aunque los resultados no son significativos. Por otra parte, los animales alimentados con la dieta CR-Soy durante 18 meses tienen unos niveles de Bcl-2 más altos que los del grupo de 6 meses de tratamiento. Se produce, asimismo, un descenso con el envejecimiento en la actividad esfingomielinasa neutra, por igual en ambos tipos de dieta, mientras que el otro parámetro medido en el sarcolema, el contenido de coenzima Q, permanece invariable.

En lo referente a la actividad de las caspasas estudiadas, resulta llamativo que, mientras que el envejecimiento no tiene efecto alguno sobre ella en los animales AL-Soy, los animales viejos sometidos a restricción calórica presentan un incremento en la actividad de las caspasas -9 y -3. Como consecuencia, observamos que la dinámica de ambas caspasas se encuentra desacoplada, por un lado, de la señalización procedente de la mitocondria y, por otro, del efecto final sobre la fragmentación del ADN.

Algunos autores han observado que la restricción calórica revierte la mayor detección de caspasa-3 y caspasa-8 procesadas en animales viejos [289, 294], pero existen diferencias entre los resultados al medir expresión (ARNm), niveles de proteína, procesamiento proteolítico y actividad enzimática propiamente dicha. Un estudio sobre ratas de 24 meses sometidas a CR muestra datos que sugieren una prevención del incremento de la actividad de las caspasas-3 y -9 con la edad en el músculo *plantaris* [296], mientras que un trabajo en el mismo modelo y edad, realizado en músculo gastrocnemio, muestra una ausencia de variaciones en la actividad con la edad y la restricción calórica [289]. La expresión de las caspasas -3, -8 y -9 no mostró cambios en un estudio de restricción calórica sobre ratas jóvenes en las que, por el contrario, sí se detectó un incremento en los niveles de proteína de la caspasa-9 [333]. La visión conjunta de estos datos nos muestra en general una ausencia de cambios o un incremento con la edad, con una reversión de los cambios por la restricción calórica. Sin embargo, la variedad de los parámetros medidos y de los resultados obtenidos hace difícil su integración.

La naturaleza de los músculos estudiados tampoco parece ser un factor fundamental, ya que los músculos *plantaris* y gastrocnemio, en rata, poseen una composición de fibras muy

parecida, con predominancia de las fibras rápidas de los tipos IID y IIB (sumando hasta el 60% del total) y un contenido en fibras lentas oxidativas del tipo I en torno al 10-20% [350-351]. A pesar de ello, los mismos parámetros medidos en ambos músculos muestran resultados diferentes, como se ha expuesto.

No tenemos constancia de trabajos que hayan medido anteriormente el efecto de la restricción calórica sobre marcadores de la familia Bcl-2 en músculo esquelético de ratones viejos. La ausencia de correlación entre los cambios en la ratio Bcl-2/Bax y la liberación de citocromo *c*, por un lado, y la actividad de las caspasas -3 y -9 por otro, puede llevar a la idea de la implicación de rutas alternativas, como la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplásmico, que actúa a través de la caspasa-3 y, según algunos estudios, de las caspasas -8 y -9 [89]. Con el objetivo de elucidar este mismo punto, el grupo de Leeuwenburgh observó, tras medir la presencia de la caspasa-12 del retículo sarcoplásmico, una correlación de los niveles de procaspasa-12 con el índice apoptótico y con el procesamiento de la caspasa-3, aunque la actividad caspasa-3 y el procesamiento de las caspasas -9 y -12 no mostraron cambios [289].

AIF correlaciona con el índice apoptótico en el mencionado estudio de Dirks y Leeuwenburgh, disminuyendo sus niveles totales (aunque no los nucleares) con la restricción calórica. Dicha correlación, aun consistiendo simplemente en la ausencia de cambios, se produce también en nuestros datos, y es revelante dada la ausencia de concordancia de la fragmentación del ADN y la actividad caspasa-3, el otro efector de mayor importancia. La posibilidad de que sea AIF el principal efector de la apoptosis mionuclear, por otro lado, debería ser confirmada con un mejor conocimiento de la dinámica de esta molécula en las fibras musculares, ya que es dependiente, al igual que la caspasa-9 a través del citocromo *c*, de la estabilidad de la membrana externa mitocondrial.

Influencia del componente graso de la dieta en la señalización apoptótica con el envejecimiento

La variación de la fuente de la grasa en una dieta de restricción calórica es una interesante aproximación experimental, al permitir trabajar en un modelo en el que se corrigen algunos de los efectos perjudiciales atribuidos a un exceso de determinados tipos de lípidos en la dieta. La restricción calórica mejora varios parámetros asociados al sistema cardiovascular y a la regulación del metabolismo general, frecuentemente afectados por dietas altas en ácidos grasos saturados, mientras que uno de sus efectos mejor caracterizados es la disminución del estrés oxidativo, que afecta especialmente a los ácidos grasos

poliinsaturados (revisado en [20]). De esta forma, cabe esperar que en un contexto de restricción calórica se pongan de manifiesto los efectos de las distintas dietas a través de su influencia sobre la estructura y función de las membranas y de la generación de lípidos señalizadores relacionados con la inflamación. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran más cambios y variaciones debidos a la grasa de la dieta que a la propia restricción calórica.

En el caso del contenido de coenzima Q en el sarcolema, se observa cómo el incremento registrado en los animales jóvenes en la dieta *CR-Fish*, y atribuido en apartados anteriores al carácter más prooxidante de los ácidos grasos altamente insaturados, no se reproduce en los animales viejos, donde el nivel de estas moléculas antioxidantes es uniforme en todas las dietas, y similar al de los grupos *CR-Lard* y *CR-Soy* a los 6 meses de tratamiento. Este descenso en la dieta *CR-Fish* con el envejecimiento es paralelo a la disminución de la cantidad de ácidos grasos n-3 en el sarcolema (EPA, DHA). No obstante, dentro de este razonamiento basado en la susceptibilidad de los lípidos al daño oxidativo, cabe la posibilidad de que la cantidad de coenzima Q que detectamos en el sarcolema sea el reflejo del contenido en PUFA de otras membranas celulares. El índice de insaturación de los ácidos grasos mitocondriales en ratones jóvenes sometidos a estas mismas dietas era mayor en el grupo *CR-Fish* que en el resto de dietas [352]. No se dispone de datos a edades más avanzadas. En cuanto al otro parámetro medido en el sarcolema, la actividad esfingomielinasa neutra, observamos que desciende en todos los grupos con el envejecimiento, y la ausencia de concordancia con cualquier otro marcador estudiado en este trabajo dificulta la interpretación de este resultado. En todo caso, es un indicador de que la inhibición por coenzima Q no resulta particularmente condicionante en este modelo, y de que la producción de ceramida no parece una vía principal de señalización de muerte celular en las fibras musculares.

Los cambios observados en la actividad de diferentes caspasas son igualmente interesantes. Ni las caspasas iniciadoras -8 y -9 ni la efectora -3 aumentan su actividad con el envejecimiento en la dieta *CR-Lard*. En la dieta *CR-Fish*, todas ellas experimentan una fuerte subida en sus niveles de actividad proteolítica, especialmente (en términos proporcionales) en el caso de las caspasas iniciadoras. Sin embargo, la dieta *CR-Soy* muestra un patrón intermedio, con inducción de las caspasas-9 y -3, pero no de la -8. Aparentemente, lo que observamos es la activación con la edad de la vía caspasa-9/caspasa-3 en las dietas *CR-Soy* y *CR-Fish*, mientras que sólo en la dieta con aceite de pescado hay una activación de la caspasa-8, presumiblemente como consecuencia de ligandos extracelulares. En el caso de las caspasas iniciadoras esto supone, además, la inversión de la leve tendencia en sentido contrario que se

puede observar en los animales jóvenes, en los que la menor actividad se encuentra en la dieta CR-*Fish*.

Sorprendentemente, la activación de la caspasa-9 no se correlaciona con la liberación de citocromo *c* al citosol ni con el equilibrio entre Bcl-2 y Bax. En el caso del citocromo *c*, los animales viejos alimentados con las dietas CR-*Lard* y CR-*Soy* presentan una mayor concentración en el citosol, mientras que los grupos con dietas basadas en aceite de soja no experimentan ese incremento. En el caso de AIF, cuya liberación se supone ligada, cuando no simultánea, a la del citocromo *c*, se observa una ausencia de variaciones ante cualquier variable empleada, ya sea dieta o edad. Además, la ratio Bcl-2/Bax, que se considera representativa de la ruta mitocondrial de la apoptosis, no justifica ninguno de los dos patrones mencionados ya que, aunque no presenta variaciones con el envejecimiento (al igual que AIF), sí lo hace en función del tipo de grasa.

La ratio Bcl-2/Bax en el músculo esquelético se correlaciona inversamente con la proporción n-6/n-3 de los ácidos grasos de la dieta. Estas diferencias entre dietas vienen dadas principalmente por las variaciones de Bax, que son similares en animales viejos y jóvenes, pero resulta llamativo también el incremento en los niveles de proteína Bcl-2 en los animales de 21 meses de todas las dietas con restricción calórica, como si dicha intervención, independientemente del tipo de grasa suministrado, estableciera una protección frente a los estímulos apoptóticos en los animales viejos. Protección que, por otra parte, no encuentra su reflejo en ninguno de los parámetros estudiados *aguas abajo* de la cascada de señalización procedente de la mitocondria.

Existe nuevamente la alternativa de la apoptosis inducida por un estrés en el retículo sarcoplásmico, orgánulo de gran importancia en el músculo esquelético. Sin embargo, no disponemos de datos relacionados con esta vía, cuya participación sería compatible con lo expuesto anteriormente al tratar las caspasas. En todo caso, ninguno de estos patrones de variación se corresponde con el resultado final que muestra una ausencia de cambios en el índice apoptótico del músculo.

La invariabilidad de índice de fragmentación del ADN con independencia de la edad o de la intervención dietética nos lleva a dos posibles consideraciones. La primera estaría relacionada con una reducida relevancia de la actividad de las caspasas y con la consideración de que sus variaciones pueden tener un efecto indicativo de la señalización, pero con poca trascendencia fisiológica en lo que se refiere al desencadenamiento de la apoptosis, quizás porque incluso los niveles elevados en CR-*Fish* representan actividades específicas muy reducidas. Así, aceptaríamos la teoría de que AIF es el principal regulador de la apoptosis muscular [216] basándonos en la ausencia de cambios en nuestros datos para ambos

parámetros, y consideraríamos la posibilidad de que la aparición efectiva de la sarcopenia del envejecimiento, así como la detección de un mayor índice apoptótico, se producen en estadios más terminales de la vida del animal, por encima de los 21 meses. La longevidad media de la población se encuentra en el entorno de los 26-27 meses, para el grupo con una dieta AL-Soy (comunicación personal de J. J. Ramsey).

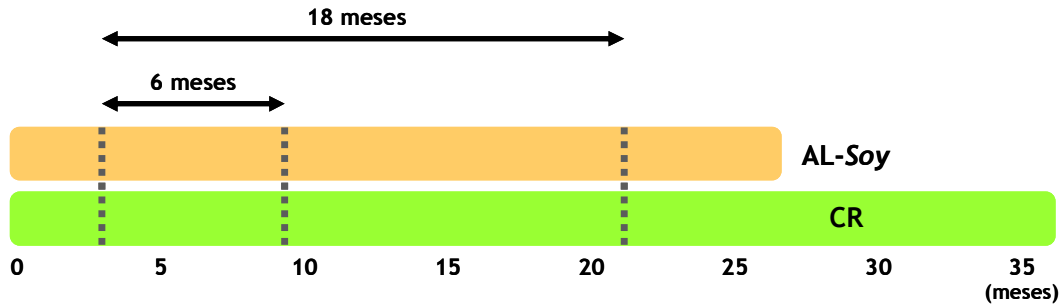


Figura 49. Duración de las intervenciones dietéticas en comparación con la longevidad media de los diferentes grupos. Los tratamientos comenzaron a los 3-4 meses de edad. La longevidad media en el grupo AL-Soy fue de 26-27 meses, mientras que en los grupos sometidos a restricción calórica osciló entre 36 y 37 meses, aproximadamente.

La segunda posibilidad es consultar otros parámetros adicionales que permitan poner en contexto los datos contradictorios de que disponemos. Al igual que ocurre en el caso de los animales de 9 meses de edad (6 meses de intervención dietética), pero con mayor motivo al tratarse de ratones viejos, la inferencia de conclusiones relacionadas con el desarrollo de la sarcopenia a partir de los datos del presente trabajo debe ser efectuada con ciertas reservas. El conjunto de experimentos diseñado en el marco de este proyecto no incluían la medida directa de parámetros de importancia para determinar la pérdida de masa muscular, como son medidas directas del tamaño y peso del músculo, o la evaluación individualizada de diversos músculos que contienen diferentes tipos de fibras predominantes. Sin embargo, como se ha visto, se han realizado o están en proceso de completarse trabajos complementarios que permiten una visión más amplia del comportamiento del músculo esquelético en los diferentes grupos dietéticos.

En el caso de que el estudio ultraestructural del gastrocnemio de los animales de 21 meses, aún en proceso, mostrara diferencias significativas en parámetros como los mencionados en el caso de los animales jóvenes, o indicios de una pérdida de funcionalidad de las fibras musculares, sería razonable replantear la capacidad de detección de mionúcleos apoptóticos por la técnica usada en nuestro trabajo, cuando no el propio papel de la apoptosis en el desarrollo de la sarcopenia del envejecimiento, en función del tipo de resultados obtenidos.

Por otro lado, el grupo de Plácido Navas y Guillermo López-Lluch en la Universidad Pablo de Olavide ha estudiado, con los mismos animales empleados en nuestros

experimentos, parámetros vinculados a la actividad física y, por tanto, potencialmente indicativos de la existencia o no de degeneración muscular. En todos los parámetros de fuerza y resistencia en carrera analizados (incluidos experimentos a velocidad creciente), llevados a cabo con los animales de 21 meses de edad (18 de intervención dietética), los mejores resultados los presentaron aquéllos alimentados con una dieta de restricción calórica con manteca de cerdo, rica en ácidos grasos saturados y ácido oleico (40% del total en cada caso), igualados con los del grupo *CR-Fish* en las medidas de velocidad-resistencia y con los de la dieta *CR-Soy* en resistencia (comunicación personal de G. López-Lluch). En el caso de las pruebas de agarre, tanto en el caso de las extremidades anteriores como de las posteriores, el grupo *CR-Lard* obtuvo unos resultados hasta un 20% por encima del resto de las dietas de restricción calórica. En este tipo de ejercicio son importantes las fibras glicolíticas de tipo II [353], las más afectadas por la degeneración muscular debida a la sarcopenia.

Estos datos son relevantes teniendo en cuenta que se han publicado estudios en humanos de edad avanzada que muestran la correlación de la velocidad de marcha con la supervivencia, por encima de otros factores [354]. El estudio de longevidad llevado a cabo en la Universidad de California (Davis) empleando una colonia de ratones alimentados con las mismas dietas usadas en este trabajo determinó que la dieta *CR-Lard* es la que proporciona la mayor longevidad máxima y media de entre todas las variantes utilizadas (comunicación personal de J. J. Ramsey).

Los resultados expuestos, junto con el resto de la información disponible, sugieren una protección del músculo esquelético en los animales alimentados durante 18 meses con la dieta *CR-Lard* frente al resto de dietas, cuya manifestación a nivel de los parámetros estudiados resulta elusiva y sólo aparece con claridad como una ausencia de inducción de la actividad de las proteasas vinculadas a la apoptosis (caspasas), sin relación aparente con la estabilidad mitocondrial ni con la apoptosis independiente de caspasas. No resulta posible descartar que nos encontremos analizando un estadio temprano del desarrollo de sarcopenia del envejecimiento, y que otras rutas de señalización sean activadas en momentos más tardíos de la vida del animal.

Efecto de las intervenciones dietéticas sobre la señalización apoptótica en el hígado

La apoptosis como proceso de reacción frente al daño celular tiene su mayor sentido fisiológico en órganos con una alta capacidad de regeneración. En estos casos, la pérdida de una reducida cantidad de células con alteraciones, que podrían desembocar en el desarrollo de potencial de transformación, no influye en la función del tejido correspondiente. El hígado, dado su papel detoxificador y su alta exposición a los metabolitos procedentes del aparato digestivo, requiere de la existencia de este mecanismo de protección. En cualquier caso, como se analizará con detalle posteriormente, el papel de la apoptosis en el daño hepático y en el desarrollo de tumores se encuentra actualmente en revisión, y el análisis de nuestros datos deberá hacerse empleando los distintos enfoques sugeridos sobre el tema.

Diferencias en la señalización apoptótica con el envejecimiento en una dieta *ad libitum* con aceite de soja

El envejecimiento provoca un incremento en los niveles de apoptosis hepática (medidos por el ensayo TUNEL de incorporación de desoxiuridina marcada), según estudios llevados a cabo en ratas y ratones [355-357], aunque con una disminución de la capacidad de respuesta apoptótica a algunos tipos de estrés genotóxico [358]. Existen además trabajos donde no se observa dicha inducción de la apoptosis en los animales viejos [359]. Nuestras medidas de fragmentación del ADN reflejan un notable incremento del índice apoptótico (3,7 veces) con el envejecimiento en la dieta *ad libitum*.

Atendiendo en primer lugar a los parámetros vinculados a la membrana plasmática, no se registraron cambios en el contenido de coenzima Q en los animales viejos, mientras que la actividad esfingomielinasa neutra se incrementó con la edad, indicando un aumento de la señalización proapoptótica debida a ceramida. Ambos parámetros fueron medidos con idéntico resultado en experimentos anteriormente realizados en nuestro grupo de investigación, en hígado de ratas jóvenes y viejas [360].

Además de la actividad esfingomielinasa, otros parámetros se incrementan también en la misma línea que la fragmentación del ADN, como ocurre con la proporción Bcl-2/Bax y la liberación de citocromo *c*. Otros autores han detectado variaciones en la ratio de los niveles de las proteínas Bcl-2/Bax y en la liberación de citocromo *c* muy similares a las de nuestras

muestras [361], mientras que algunos estudios han mostrado que, a nivel transcripcional, la expresión de los genes *Bax*, *Bcl2* y *Bcl2l1* (que codifica Bcl-xL) no varía con la edad en el hígado de ratas Fischer 344 [362] y que la expresión del gen antiapoptótico *Mcl1* es inducida en el hígado en animales viejos, al igual que la del gen *Aip6*, también inhibidor de la muerte celular [363]. Sin embargo, el sentido fisiológico de estas variaciones en la expresión génica debe ser tomado con las cautelas requeridas por la complejidad de las interacciones entre las proteínas de esta familia, y ser estudiado en un contexto más completo en el que se analicen también los eventos sucesivos en la cascada de señalización. Sin haber determinado los niveles de proteínas de la familia Bcl-2, otros grupos han hallado también incrementos en el citocromo *c* citosólico en el hígado de ratas Wistar de 22 meses [364].

Uno de los puntos de consenso en la literatura sobre la apoptosis hepática en relación con el envejecimiento es la intervención de las caspasas -9 y -3. Se han documentado incrementos en la actividad y/o los niveles de proteína de los fragmentos activos de ambas caspasas en el hígado de ratas de 25 meses [361, 365-367], en correlación con el índice apoptótico o la detección por TUNEL, o bien como dato aislado. La caspasa-8 ha sido menos estudiada, pero no se observan cambios con la edad en un trabajo en el que se constata el incremento de la caspasa-9 y de las efectoras -3, -6 y -7 [367]. Aun así, la sensibilidad de los hepatocitos a la señalización extracelular de muerte o supervivencia lleva a pensar que la caspasa-8 debe jugar un papel importante en la transducción de señales de los receptores de la superfamilia del receptor de TNF- α .

En contra de este mencionado consenso, nuestros datos apuntan a un descenso de la actividad de las caspasas-3 y -8 en los ratones de 21 meses de edad, y una tendencia descendente en la caspasa-9 cuya relevancia se debe únicamente al contexto proporcionado por las otras dos medidas ($p = 0,1$). El único precedente para estos resultados lo podemos encontrar en un trabajo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en un proyecto no relacionado, en el que se determinaron diversos parámetros vinculados a apoptosis en ratas jóvenes y viejas alimentadas con aceite de oliva o con aceite de girasol [360]. Los cambios observados en dicho estudio constituyeron una novedosa demostración de la relevancia del componente graso de la dieta en la regulación de la señalización apoptótica del hígado. Se constató así que el tejido hepático de ratas viejas (24 meses) alimentadas con dietas que contenían aceite de girasol como grasa principal mostraba una menor actividad de las caspasas -9 y -3 con respecto a las ratas jóvenes (6 meses), y la caspasa-8 descendía con respecto al nivel de los adultos jóvenes (12 meses).

El análisis conjunto de ambos resultados, en contraste con los obtenidos en el resto de casos (en los que la dieta, por regla general, no es especificada), lleva a buscar similitudes en

el diseño experimental. Existe una gran variedad de aceites vegetales, que presentan distintas abundancias relativas de los diversos tipos de ácidos grasos. Dentro de estas diferencias, los aceites de girasol y soja usados en los dos experimentos mencionados presentan importantes parecidos: aproximadamente la mitad de los ácidos grasos presentes en ellos son moléculas de ácido linoleico (precursor de la serie n-6), mientras que el ácido oleico, monoinsaturado, es el segundo en abundancia (la ratio n-6/n-3 es más elevada en el aceite de girasol, que contiene menor cantidad de ácido linolénico). Por lo tanto, consideramos que ambos resultados podrían estar relacionados y responder a un mismo proceso biológico, vinculado con la composición de estos aceites vegetales.

Entre los mecanismos que podrían explicar dicha situación, encontramos la posibilidad de un incremento de la señalización proinflamatoria, causado por la abundancia relativa de ácidos grasos poliinsaturados n-6 en la dieta (**figura 50**). Se ha descrito cómo dietas ricas en ácidos grasos n-6 contribuyen a inducir procesos inflamatorios, mientras que aceites con un mayor contenido de la serie n-3 revierten dichos efectos. La generación de ácido araquidónico a partir del precursor de la serie permite la síntesis de eicosanoides proinflamatorios que afectan a diversos procesos en el organismo. Dicha señalización inducida por la dieta podría superponerse al estado de inflamación crónica que se asocia al envejecimiento.

Existen evidencias de que la producción de eicosanoides influye sobre la señalización apoptótica, ya que se ha observado que la sobreexpresión de ciclooxigenasa-2 en hígado impide la apoptosis, mientras que la inhibición de dicha enzima provoca la muerte en células de carcinoma hepatocelular [368-369].

El factor de necrosis tumoral TNF- α es una citoquina con múltiples funciones que regulan el funcionamiento del sistema inmune, en particular por lo que respecta a procesos inflamatorios, cuya inducción depende en gran medida de esta molécula. Es capaz de inducir apoptosis a través de su receptor TNFR1, cuya expresión en hepatocitos y células de Kupffer se incrementa en diversas enfermedades crónicas y en estados de inflamación [370-371]. Sin embargo, la principal vía de señalización de TNF- α estimula la supervivencia de la célula, a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B. Resulta llamativo que entre los genes cuya expresión se regula por NF- κ B se encuentran proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Bcl-xL, A1 y Bcl-2) y proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) como XIAP [372-373] Este patrón de activación de genes es dependiente de tejido y muestra una elevada plasticidad. XIAP ejerce además un papel central en la señalización de supervivencia celular, ya que no sólo inhibe la actividad de las caspasas -9 y -3 sino que es un potente inductor del

propio factor NF- κ B [374-375]. Además, inhibe la apoptosis mediada por los receptores de TRAIL, una vía extrínseca análoga a la de TNF- α [376].

Los animales viejos de la dieta AL-Soy muestran unos niveles de proteína XIAP seis veces mayor que los jóvenes. Como consecuencia, la actividad caspasa-3 se ve inhibida, y la actividad caspasa-9 tiende a decrecer, con respecto a los animales con 6 meses de tratamiento. En el referido estado inflamatorio, NF- κ B promueve también la expresión de cFLIP, un inhibidor de la actividad caspasa-8, cuyo descenso hemos podido constatar [377].

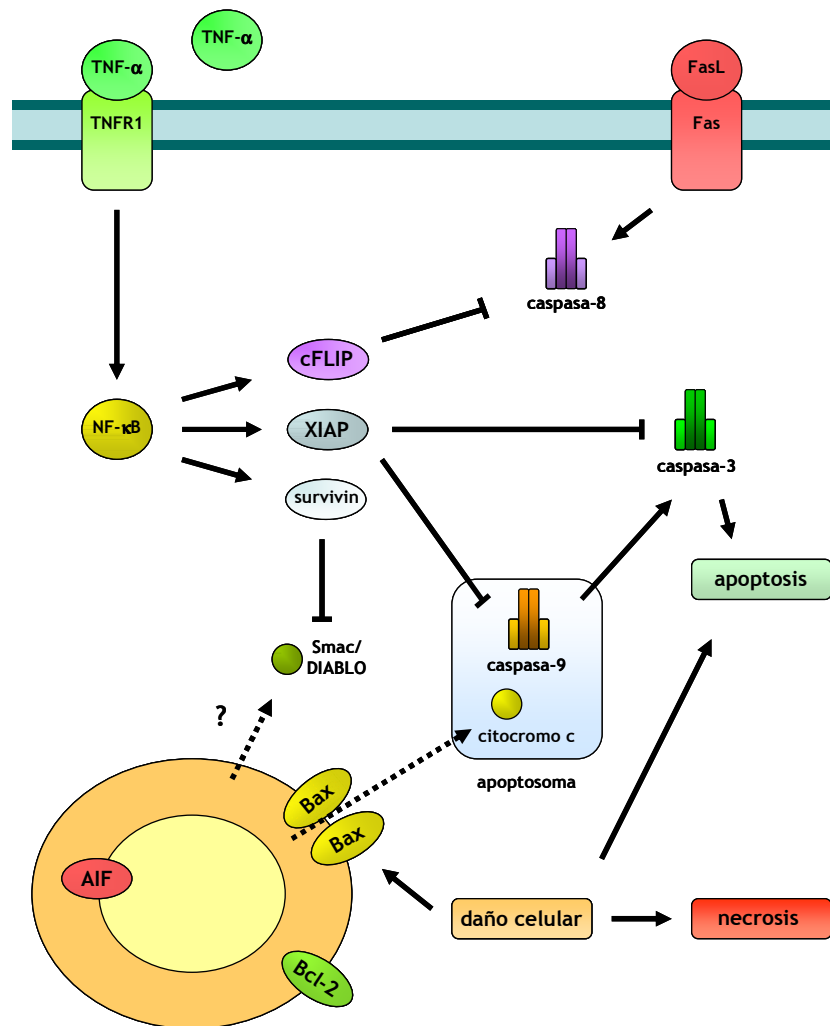


Figura 50. Modelo propuesto para la señalización apoptótica observada en animales viejos de la dieta AL-Soy. El envejecimiento y la predominancia de PUFA de la serie n-6 en la dieta generan un estado inflamatorio que se traduce en la expresión de genes de supervivencia celular regulados por NF- κ B. Dichos genes inhiben la respuesta apoptótica al daño celular en parte de la población de hepatocitos, produciéndose en algunos casos muerte no controlada (necrosis).

Se ha postulado que el incremento en los niveles de apoptosis en el hígado de roedores con la edad se debe a la eliminación de células dañadas o con potencial transformante [355]. De acuerdo con nuestras medidas de actividad caspasa en AL-Soy, la

acumulación de daño oxidativo en los hepatocitos no se traduce en apoptosis debido a la acción de XIAP. Sin embargo, existe un estímulo apoptótico procedente de la mitocondria, reflejado en la ratio Bcl-2/Bax y en la liberación de citocromo *c* al citosol, que podría ser consecuencia de daños celulares de diversa naturaleza. En condiciones normales, la vía intrínseca de la apoptosis activa la caspasa-3, una de cuyas principales dianas es la poli-(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP1), una enzima de reparación del ADN cuya activación consume grandes cantidades de ATP. El objetivo de la proteólisis de PARP-1 es evitar que su actividad provoque la depleción de ATP en la célula y la consiguiente muerte por necrosis [378]. Ante el bloqueo de las caspasas por XIAP, el daño celular acumulado se puede traducir, por tanto, en necrosis, que puede ser también detectada en forma de fragmentación del ADN con el mismo método que nosotros hemos empleado, debido a la acción de las ADNasas de los macrófagos encargados de eliminar los restos celulares [102].

Existen al menos dos puntos a considerar en este modelo propuesto para explicar los datos obtenidos. Por un lado, la salida del citocromo *c* al citosol implica la posibilidad de liberación de otras proteínas proapoptóticas del espacio intermembrana de la mitocondria. No hemos detectado cambios en la liberación de AIF al citosol que pudieran indicar una estimulación de la vía independiente de caspasas. Esta discordancia con la dinámica del citocromo *c* es explicable en función de la liberación secuencial de estas proteínas, cuya regulación aún no está del todo explicada. Se han descrito ejemplos de esta liberación retardada de AIF y se ha demostrado el requerimiento, en determinadas situaciones, de la activación de caspasas para la salida al citosol de AIF y la endonucleasa G [150, 379].

La proteína Smac/Diablo también es liberada desde el espacio intermembrana, y se cree que se transloca al citosol de una manera similar y simultánea a la del citocromo *c* [150, 380]. Esta proteína es el principal inhibidor de XIAP y su función en condiciones fisiológicas es permitir la apoptosis una vez que Bid ha amplificado la señal procedente de los receptores de muerte celular, a través de la permeabilización de la membrana mitocondrial. No disponemos de datos sobre el nivel citosólico de Smac/Diablo, pero entre los genes inducidos por NF- κ B se encuentra el que codifica la proteína survivina, de la familia de las IAPs [381-382], capaz de unirse a Smac/Diablo e inhibir su función, permitiendo que XIAP continúe inhibiendo la actividad de las caspasas [383].

El segundo factor a considerar es el incremento en los niveles de la chaperona Hsp70, con funciones antiapoptóticas y capaz de inhibir la cascada de señalización a varios niveles. Sin embargo, Hsp70 es también capaz de evitar la activación de NF- κ B mediante la interacción con IKK, la kinasa encargada de liberar de su represor a dicho factor de transcripción [384]. En este caso, Hsp70 podría encontrarse inducida como consecuencia de diversas fuentes

intracelulares de estrés, sin que aparentemente ejerza una acción inhibitoria sobre la señalización de NF- κ B.

Por otra parte, esta situación de inhibición de la apoptosis hepática podría dar como resultado un incremento en la incidencia de neoplasias, uno de cuyos rasgos más repetidos es la sobreexpresión de XIAP. No disponemos aún de datos sobre el número de ratones de la dieta AL-Soy que desarrollaron tumores en el estudio de longevidad de la Universidad de California en Davis. Los tumores hepáticos son la causa de la muerte en el 6% de los ratones macho de la línea C57BL/6, y otro 6% muere debido a enfermedades vinculadas a procesos inflamatorios [385].

Efecto de la restricción calórica sobre la señalización apoptótica hepática

Al aplicar una restricción calórica del 40% sobre una dieta *ad libitum* con aceite de soja, no hemos encontrado ninguna variación en las medidas de fragmentación del ADN en animales jóvenes o viejos, ni tampoco hemos observado que la restricción calórica determine un patrón de variación distinto en ambas dietas debido al envejecimiento: en ambos casos se produce un incremento de similar magnitud en los animales de 21 meses de edad.

En el resto de parámetros observamos algunos cambios. La restricción calórica reduce los niveles de Bax y tiende a incrementar los de Bcl-2 en cada grupo de edad, de manera que la ratio Bcl-2/Bax tiende a ser mayor en los animales del grupo CR-Soy ($p = 0,035$ según un ANOVA de dos vías). La liberación de citocromo *c* al citosol aumenta en los animales viejos de forma similar a como ocurre en la dieta AL-Soy, aunque los niveles citosólicos de AIF son más bajos que en los individuos jóvenes CR-Soy.

La restricción calórica causa un descenso del 70% en los niveles de XIAP. Las caspasas -8 y -9 tienden a incrementar su actividad, pero la caspasa efectora -3 desciende con el envejecimiento al igual que ocurría en la dieta AL-Soy. Los niveles de Hsp70 son mayores en los animales viejos y, en general, tienden a subir en los ratones sometidos a CR.

Existe debate en torno al papel de la restricción calórica en la apoptosis hepática. Los primeros trabajos al respecto mostraron que en ratones de una cepa propensa a desarrollar tumores se producía un incremento en los niveles de apoptosis con la restricción calórica a largo plazo, que se sumaba al propio incremento debido al envejecimiento [355, 386]. Similares efectos fueron encontrados en ratas sometidas a 95 días de restricción calórica [387], señalando en ambos casos que la apoptosis podría estar contribuyendo a la eliminación de potenciales centros de formación de neoplasias.

Otros grupos, por el contrario, han observado una tendencia al descenso en la apoptosis en el hígado de ratas sometidas a CR de larga duración [388]. Estudios posteriores con ratas sometidas a diversos periodos (del orden de meses) de restricción calórica mostraron una ausencia de cambios en la intensidad de la apoptosis [389] o un incremento en la fragmentación del ADN [329].

En lo referente a los mecanismos implicados, la información es muy limitada. Se ha descrito un incremento en la expresión del gen proapoptótico *Bak1* en el hígado de ratones como consecuencia de la restricción calórica de larga duración [363], y ausencia de cambios en el caso de *Bax* y *Bcl2* en hígado de ratas [362]. Mientras que la expresión de *Fas* y la detección del receptor Fas mediante inmunohistoquímica se incrementa en el hígado de ratas viejas, la restricción calórica revierte parcialmente este efecto, en lugar de potenciarlo [356, 362]. Por otro lado, el grupo de Leeuwenburgh ha observado cómo a los dos meses de restricción calórica del 40%, se incrementa el índice apoptótico en el hígado de ratas jóvenes, descendiendo sorprendentemente los niveles de las procaspasas y caspasas -3, -7, -12, sin cambios en XIAP ni Hsp70 y con una tendencia al incremento de la caspasa-9 [329]. Nuestros resultados muestran un descenso en la actividad de las caspasas en los animales jóvenes sometidos a restricción calórica, pero sin cambios en el índice apoptótico. Adicionalmente, en dicho trabajo se sugiere una implicación de la apoptosis independiente de caspasas (AIF), una vía relevante en la inducción de muerte celular en varios tipos de tumores.

La restricción calórica retrasa y atenúa el estado de inflamación crónica vinculado al envejecimiento, y reduce de manera generalizada los niveles de diversos marcadores relacionados con la inflamación (revisado en [20]). La CR reduce los niveles de TNF- α [390-391] y la expresión y/o activación de NF- κ B [392-393]. Como consecuencia, los genes promotores de supervivencia e inhibidores de la apoptosis regulados por esta vía no se encontrarán activos en la misma medida en que lo están en el caso de la dieta AL-Soy, lo cual explica el pronunciado descenso en los niveles de proteína de XIAP debido a la restricción calórica (-70%) y el hecho de que la caspasa-8 pase a aumentar su actividad con respecto a los animales jóvenes de la dieta CR-Soy (+50%), invirtiendo su evolución en el grupo AL-Soy. La misma inversión de tendencia sucede para la caspasa-9, aunque nuevamente sin cambios estadísticamente significativos. La caspasa-3, sin embargo, sigue mostrando valores más bajos de actividad con la edad en la dieta CR-Soy, en contraste con el incremento de la fragmentación del ADN.

Esta situación responde a la restauración de la normalidad en las rutas que regulan la muerte celular en los hepatocitos, con la señalización siendo transmitida por la caspasa-8

hacia la mitocondria (a través de tBid), donde se integra con los estímulos proapoptóticos procedentes del daño interno de la célula, en caso de existir, y se transmite hacia la caspasa-9 mediante la liberación de citocromo *c* al citosol (**figura 51**). El equilibrio entre los miembros de la familia Bcl-2 que observamos en nuestros datos es indicativo (se corresponde con el incremento en el citocromo *c* citosólico), aunque necesariamente incompleto al existir otras proteínas antiapoptóticas (Bcl-xL, Mcl-1) y proapoptóticas (Bak) que juegan un importante papel en la muerte celular en el hígado.

Sin embargo, el aspecto menos claro de los resultados es la identificación de la molécula efectora responsable del incremento en el índice apoptótico (x5) con el envejecimiento. Resulta evidente la discrepancia entre dicho incremento y los descensos en los niveles de AIF citosólico y actividad caspasa-3 con respecto a los animales jóvenes. Los efectos contrastados de la restricción calórica sobre la inflamación crónica y el propio conjunto de resultados descartan la participación significativa de procesos de muerte celular no controlada en los animales CR-Soy, los cuales, por otra parte, sólo se encuentran en el 50-60% de su longevidad media, mientras que los AL-Soy se aproximan al 80% en el momento del sacrificio.

Se pueden sugerir varias consideraciones al respecto. En primer lugar, las reservas necesarias a la hora de correlacionar directamente la actividad de la caspasa-3 o la liberación de AIF con el índice apoptótico, ya que los niveles de expresión o actividad de enzimas que dependen de ambas vías pueden variar, y con ellos la susceptibilidad de la célula a los estímulos apoptóticos. El grado de amplificación que la caspasa-3 reciba por parte de otras caspasas efectoras (principalmente, la caspasa-7), de las ADNasas asociadas a la apoptosis y de otras enzimas, determinará la efectividad de los últimos estadios del proceso de muerte celular. Similares argumentos pueden aplicarse a la apoptosis independiente de caspasas mediada por AIF y la endonucleasa G.

Por otra parte, no toda la fragmentación del ADN que se produce en la apoptosis es debida a factores procedentes de la propia célula, ya que es tras la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos, por parte de las células de Kupffer y de las células estrelladas o de Ito, cuando se completa la degradación del material genético (revisado en [394]), de modo similar a lo que ocurre en otros tejidos [102, 395]. Es más, después de la fagocitosis, la presencia de material genético en los cuerpos apoptóticos influye sobre la generación de moléculas quimiotácticas en las células estrelladas hepáticas a través de receptores TLR9 situados en endosomas [396].

En conclusión, estimamos que los valores observados de fragmentación del ADN no entran en conflicto con los niveles de los efectores, sino que contribuyen a la comprensión del resultado final del proceso que, de otro modo, quedaría incompleta. Un aumento en los

niveles de apoptosis con el envejecimiento, también en una dieta de restricción calórica, puede ser explicado por la retirada controlada de células que acumulen cualquier tipo de daño.

Alteraciones en la señalización apoptótica hepática en función del tipo de componente graso en dietas de restricción calórica

Los tres grupos de animales sometidos a restricción calórica con distintos tipos de componente graso en la dieta mostraron, de acuerdo con los resultados, procesos de señalización apoptótica muy similares entre sí. El envejecimiento provocó, en todos los casos, el aumento en la actividad caspasa-8, un descenso o tendencia al descenso en la ratio Bcl-2/Bax, un incremento en la liberación de citocromo *c* al citosol, un aumento en los niveles de XIAP y una tendencia a aumentar la actividad caspasa-9. Todo ello concuerda con una inducción de la señalización apoptótica en los animales viejos, la cual, regulada por el incremento en el inhibidor XIAP, se convierte realmente en un incremento de la capacidad de respuesta apoptótica (*responsiveness*) ante cualquier daño o estímulo de muerte celular.

Hsp70 tiende al incremento en animales viejos de los grupos CR-*Lard* y CR-*Soy*, pero no de la dieta CR-*Fish*, y además muestra una fuerte dependencia del tipo de grasa, ya que los niveles detectados parecen alcanzar un máximo los animales de esta última dieta. Los niveles de AIF citosólico decrecen en los grupos CR-*Soy* y CR-*Fish*. La caspasa-3 únicamente muestra un descenso con el envejecimiento en la dieta CR-*Soy*, como se ha explicado anteriormente, mientras que no varía en las demás dietas, ni con la edad ni en función del tipo de grasa.

En cualquier caso, la variación más relevante es la ausencia de incremento en la fragmentación de la cromatina con el envejecimiento en los animales del grupo CR-*Lard*. Tanto en los otros grupos de restricción calórica como en la dieta AL-*Soy* se registra un incremento del índice apoptótico hasta niveles similares en todos los casos, mientras que los ratones viejos alimentados con un 7% de manteca de cerdo y en condiciones de restricción calórica presentan unos niveles comparables o incluso menores que los de ratones jóvenes de otras dietas. Resulta llamativa la coincidencia de este parámetro con los análisis llevados a cabo mediante microscopía electrónica, que indican que el tamaño de los núcleos de los hepatocitos aumenta con el envejecimiento en todas las dietas, exceptuando en el grupo CR-*Lard*. La coincidencia en el comportamiento de ambos parámetros nos lleva a considerar la posibilidad de que el grado de poliploidía de los hepatocitos, un fenómeno aún no completamente explicado, pueda tener algún papel en la regulación de la muerte celular.

Se observa una dependencia de algunos parámetros respecto del tipo de grasa de la dieta, que además resulta variable en función de la edad. Los niveles de Hsp70 aumentan a medida que disminuye la ratio n-6/n-3 en la dieta, en lo que podría ser interpretado como una respuesta de la célula ante mayores niveles de estrés, que podrían potencialmente desembocar en apoptosis.

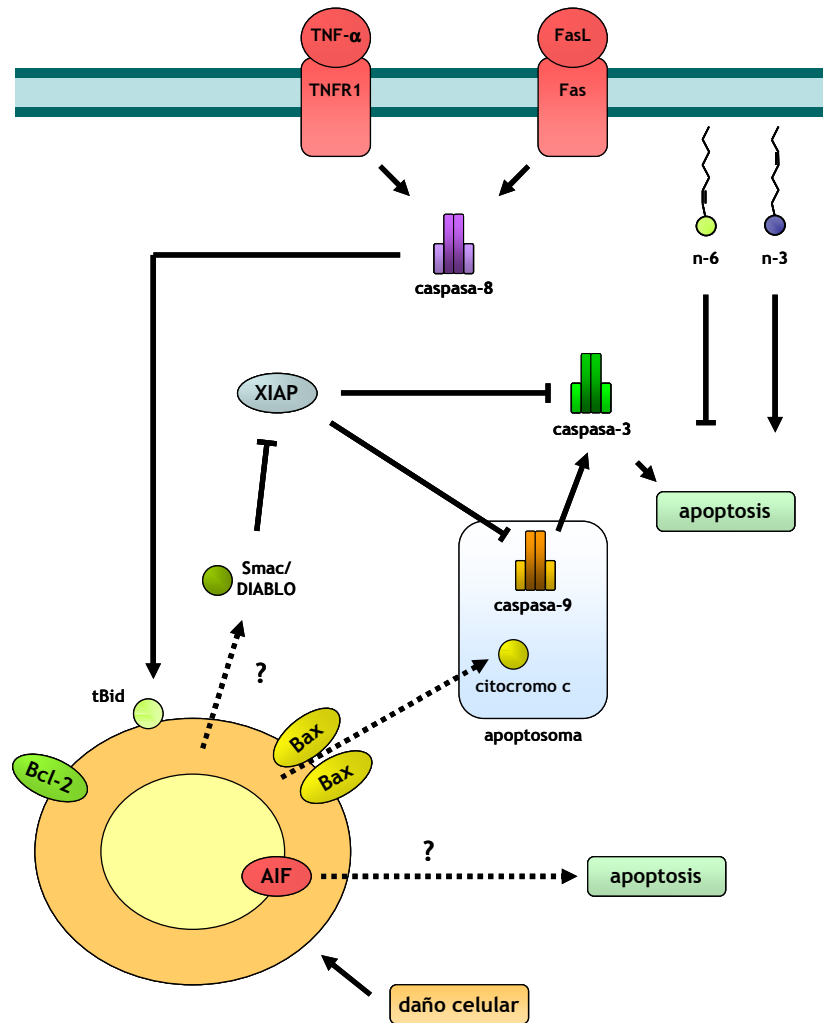


Figura 51. Modelo propuesto para la señalización apoptótica observada en animales viejos de las dietas de restricción calórica. La señalización a través de la caspasa-8 y las señales de daños celulares confluyen en la mitocondria, permitiendo la liberación de citocromo *c* al citosol y la inducción de las caspasas moduladas por XIAP.

En los animales jóvenes observamos cómo la actividad de las caspasas iniciadoras correlaciona negativamente con el índice apoptótico, que es menor en el grupo CR-*Lard* y mayor en la dieta CR-*Fish*. En los animales viejos, al tiempo que desaparecen las tendencias en la actividad caspasa en función de la dieta, se acentúan las diferencias en los niveles de fragmentación del ADN. La liberación de citocromo *c* al citosol es mayor en los animales viejos del grupo CR-*Lard*, intermedia en el grupo CR-*Soy* y menor en los CR-*Fish*, y los niveles de XIAP son menores en los animales jóvenes CR-*Lard*. La integración de todos estos parámetros

en un único planteamiento es necesariamente compleja, pero resulta llamativo cómo el hígado de los animales del grupo CR-*Fish* parece mostrar una mayor eficacia en la respuesta de muerte celular para un mismo nivel de señalización apoptótica. Los animales de la dieta CR-*Lard*, con más citocromo *c* en el citosol (a los 21 meses de edad) y más actividad de las caspasas -8 y -9, así como con menores niveles de XIAP (a los 9 meses), siempre presentan un menor índice apoptótico. Resulta lógico considerar que existen mecanismos adicionales de regulación que no han sido caracterizados en este estudio, y que podrían explicar dichas diferencias.

La variación en los niveles citosólicos de AIF en las dietas de restricción calórica, por otro lado, indica que no es posible descartar que diversas rutas apoptóticas actúen con mayor o menor intensidad en función de la grasa de la dieta. AIF es una proteína vinculada a la membrana mitocondrial interna y, por lo tanto, podría ser sensible a cambios en la composición o función de las membranas a la hora de regular su liberación al citosol. Cabe señalar, también, que AIF es una de las dianas de la inhibición ejercida por Hsp70 sobre la apoptosis, y que los niveles de ambos en el citosol de animales viejos correlacionan de forma inversa.

Se ha descrito en numerosos trabajos la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados de inducir la apoptosis en células tumorales [253], especialmente los PUFA de la serie n-3, entre los que destaca el ácido docosahexaenoico [397-399]. Una de los mecanismos implicados en la estimulación de la apoptosis es la inhibición de la generación de derivados del AA a través de la enzima COX-2 [400].

En lo referente a la composición de membrana, la dieta CR-*Fish* presenta una cantidad mucho mayor de ácidos grasos n-3 (EPA y DHA, principalmente) y una mayor proporción de n-3 sobre el total de HUFA, pero las escasas diferencias al respecto entre las dietas CR-*Lard* y CR-*Soy* parecen descartar una explicación basada únicamente en este factor. El único parámetro de los perfiles de ácidos grasos que muestra un patrón coincidente con los niveles de apoptosis en animales viejos es la abundancia relativa de ácido araquidónico. La presencia de AA es significativamente mayor en la dieta CR-*Lard* que en las otras dos de restricción calórica, que no presentan cambios entre sí. De hecho, sus niveles son similares a los de la dieta AL-*Soy*, cuya proporción n-6/n-3 en la ingesta es mucho menor.

Conviene hacer una salvedad acerca de la importancia de la presencia de ácido araquidónico en la membrana plasmática u otras membranas. Su detección en los animales CR-*Lard* en mayor medida que en el resto de las dietas es explicable por la elevada proporción n-6/n-3 en la dieta, que permite una alta actividad desaturasa del precursor, el ácido linoleico, el cual supone un 15% del total de la grasa ingerida. Sin embargo, la abundancia de los ácidos

grasos n-6 es mucho mayor en la dieta AL-Soy, donde el ácido linoleico supone el 55% del total. Esto permite postular la existencia de diferentes acciones en ambos casos, y es posible que esa abundancia de ácidos grasos n-6 permita que la actividad proapoptótica de ácidos como el γ -linolénico (18:3 n-6, sin cambios apreciables en el perfil lipídico) o del propio ácido araquidónico en su forma libre, como ha sido sugerido en varios estudios (revisado en [253]), eleve los niveles de muerte celular en los animales viejos de la dieta CR-Soy en una medida comparable a la de los CR-Fish.

En todo caso, una cuestión relevante a plantear es si dicha contención aparente de la apoptosis observada en la dieta CR-Lard es perjudicial o beneficiosa para el organismo. Si bien históricamente se ha considerado la apoptosis como una forma de eliminar células potencialmente tumorigénicas, varios artículos recientes han aumentado el debate en torno a esta idea. Se ha demostrado que ratones que no expresan en sus hepatocitos el gen antiapoptótico *Mcl-1* muestran no sólo un incremento de la apoptosis, como era esperable, sino un aumento en el daño hepático, en rasgos de arquitectura aberrante del órgano y, finalmente, una mayor incidencia de hepatocarcinomas, probablemente inducida a través de un mecanismo de proliferación compensatoria [401]. Para comprobar que el efecto no se debía a funciones no apoptóticas de estas moléculas (*Mcl-1* interviene también en la regulación del ciclo celular), se generaron ratones KO en hepatocitos para el gen que codifica *Bcl-xL*, que exhibieron también un fenotipo similar, y ratones KO en hepatocitos para el gen *Bak*, que mostraron una reducida incidencia de tumores [402]. Los niveles de TNF- α correlacionaron en todos los casos con la susceptibilidad a hepatocarcinogénesis.

La relación entre apoptosis, daño hepático y hepatocarcinogénesis es, por lo tanto, ambigua y está lejos de ser totalmente elucidada. En el estudio de longevidad llevado a cabo en el marco del proyecto en el que se enmarca la presente Tesis, los animales del grupo CR-Lard mostraron una mayor longevidad media y máxima que el resto de las dietas de restricción calórica (comunicación personal, J. J. Ramsey), a pesar de los efectos anti-inflamatorios y antitumorales descritos para los ácidos grasos n-3. No se dispone de datos sobre incidencia de tumores, pero su relevancia como causa de muerte diferencial entre dietas debería ser limitada, ya que tan sólo un 0,5% de los ratones C57BL/6 en restricción calórica mueren como consecuencia de hepatocarcinomas [385]. Un contexto de restricción calórica permite, por lo tanto, aflorar efectos de la grasa de la dieta que quedan enmascarados por las desventajas que se derivan de ella en la ingesta *ad libitum*. Los mecanismos exactos que intervienen deben aún ser estudiados en profundidad, pero consideramos que los datos presentados son de utilidad para comprender la importancia del componente lipídico sobre la

apoptosis durante el envejecimiento, un proceso celular de evidente relevancia en el desarrollo de enfermedades de diversa naturaleza.

Discusión general y perspectivas

En su conjunto, los resultados expuestos en la presente Tesis constituyen el primer estudio del efecto de la grasa de la dieta sobre la señalización apoptótica en condiciones de restricción calórica. Los datos obtenidos permiten constatar una modulación de los procesos relacionados con la muerte celular que resulta dependiente del tejido estudiado, del envejecimiento, y de los ácidos grasos predominantes en la dieta, abriendo la puerta a futuras investigaciones que analicen en detalle los mecanismos e interacciones subyacentes, así como a una mejor comprensión general de la regulación de la apoptosis.

La relación entre el aumento de la longevidad inducido por una dieta de restricción calórica que incluye grasas saturadas y monoinsaturadas, y los cambios en la señalización apoptótica y otros parámetros detectados en los animales sometidos a dicha dieta deberá ser objeto de estudios adicionales.

Está previsto continuar el análisis de los efectos del componente graso de la dieta, en combinación con la restricción calórica, sobre procesos relacionados con la bioenergética y la muerte celular, en el marco de un nuevo proyecto colaborativo internacional planteado sobre la base de los datos obtenidos por los grupos participantes en los últimos años.

El objetivo de este proyecto consistirá en estudiar los mecanismos que permiten que grasas monoinsaturadas o saturadas prolonguen la longevidad en condiciones de restricción calórica, en contraste con el efecto similar de los ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 en condiciones de ingesta *ad libitum*.

CONCLUSIONES

- 1) Las intervenciones dietéticas basadas en las alteraciones del componente graso de la dieta constituyen un abordaje experimental válido para modificar la composición lipídica de las membranas en un contexto de restricción calórica.
- 2) La restricción calórica determina el establecimiento de un ambiente antiapoptótico en las fibras de músculo esquelético de animales jóvenes, que resulta potenciado por el aceite de pescado, afectando principalmente a reguladores tempranos de la señalización apoptótica, y que no se transmite en su integridad a los ejecutores de la muerte celular programada. Este efecto desaparece como consecuencia del envejecimiento.
- 3) La transmisión de la señalización apoptótica a través de los marcadores estudiados en el hígado, en contraste con los resultados observados en el músculo esquelético, indica que el efecto del componente graso de la dieta en un contexto de restricción calórica sobre los parámetros estudiados es dependiente del tejido.
- 4) Los parámetros correspondientes a estadios terminales de las rutas de muerte celular (activación de caspasas y fragmentación de la cromatina) muestran una atenuación de la apoptosis vinculada al envejecimiento, tanto en músculo como en hígado, cuando la dieta de restricción calórica incluye manteca de cerdo como componente graso. Estos datos coinciden con el incremento de la longevidad y la mejora de la capacidad física de los animales de dicho grupo.

CONCLUSIONS

- 1) Dietary interventions with changes in the main fat source provide a useful experimental frame within a calorie restriction model.
- 2) Calorie restriction causes an antiapoptotic environment in skeletal muscle fibres, which is enhanced by fish oil and affects early regulators of the signalling cascade. These changes are not fully transmitted to the final effectors, and are lost during aging.
- 3) The apoptotic signalling cascades in liver, in contrast with our results in skeletal muscle, indicate a tissue-dependent regulation of death cell by dietary fat in calorie-restricted animals.
- 4) Caspase activities and DNA fragmentation tend to decrease in calorie-restricted aged animals when the dietary fat source is lard. These data are consistent with an increase in longevity and physical performance exhibited by CR-*Lard* aged mice.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kirkwood, T.B., *Understanding the odd science of aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 437-47.
2. Hayflick, L., *Biological aging is no longer an unsolved problem*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 1-13.
3. Sahin, E., et al., *Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise*. Nature, 2011. **470**(7334): p. 359-65.
4. Kim Sh, S.H., P. Kaminker, and J. Campisi, *Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending*. Oncogene, 2002. **21**(4): p. 503-11.
5. Medvedev, Z.A., *An attempt at a rational classification of theories of ageing*. Biol Rev Camb Philos Soc, 1990. **65**(3): p. 375-98.
6. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
7. Harman, D., *The biologic clock: the mitochondria?* J Am Geriatr Soc, 1972. **20**(4): p. 145-7.
8. Pamplona, R., G. Barja, and M. Portero-Otin, *Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation?* Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 475-90.
9. Hulbert, A.J., *Life, death and membrane bilayers*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 14): p. 2303-11.
10. Halliwell, B., *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radic Res, 1999. **31**(4): p. 261-72.
11. Chance, B. and G.R. Williams, *The respiratory chain and oxidative phosphorylation*. Adv Enzymol Relat Subj Biochem, 1956. **17**: p. 65-134.
12. Barja, G., *Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity*. J Bioenerg Biomembr, 1999. **31**(4): p. 347-66.
13. Bartosz, G., *Reactive oxygen species: destroyers or messengers?* Biochem Pharmacol, 2009. **77**(8): p. 1303-15.
14. Boonstra, J. and J.A. Post, *Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells*. Gene, 2004. **337**: p. 1-13.
15. Pamplona, R., et al., *Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: the pigeon and human case*. Mech Ageing Dev, 1996. **86**(1): p. 53-66.
16. Portero-Otin, M., et al., *Correlation of fatty acid unsaturation of the major liver mitochondrial phospholipid classes in mammals to their maximum life span potential*. Lipids, 2001. **36**(5): p. 491-8.
17. Pamplona, R., et al., *Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals*. Mech Ageing Dev, 2000. **112**(3): p. 169-83.
18. Pamplona, R., et al., *Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals*. J Lipid Res, 1998. **39**(10): p. 1989-94.

19. Herrero, A., et al., *Effect of the degree of fatty acid unsaturation of rat heart mitochondria on their rates of H₂O₂ production and lipid and protein oxidative damage*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(4): p. 427-43.
20. Speakman, J.R. and S.E. Mitchell, *Caloric restriction*. Mol Aspects Med, 2011. **32**(3): p. 159-221.
21. Fabrizio, P. and V.D. Longo, *The chronological life span of Saccharomyces cerevisiae*. Aging Cell, 2003. **2**(2): p. 73-81.
22. Braeckman, B.P., L. Demetrius, and J.R. Vanfleteren, *The dietary restriction effect in C. elegans and humans: is the worm a one-millimeter human?* Biogerontology, 2006. **7**(3): p. 127-33.
23. Bross, T.G., B. Rogina, and S.L. Helfand, *Behavioral, physical, and demographic changes in Drosophila populations through dietary restriction*. Aging Cell, 2005. **4**(6): p. 309-17.
24. Weindruch, R., *Effect of caloric restriction on age-associated cancers*. Exp Gerontol, 1992. **27**(5-6): p. 575-81.
25. Caro, P., et al., *Forty percent and eighty percent methionine restriction decrease mitochondrial ROS generation and oxidative stress in rat liver*. Biogerontology, 2008. **9**(3): p. 183-96.
26. Weindruch, R., *The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates*. Toxicol Pathol, 1996. **24**(6): p. 742-5.
27. Merry, B.J., *Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(11): p. 1340-54.
28. Merry, B.J., *Dietary restriction in rodents--delayed or retarded ageing?* Mech Ageing Dev, 2005. **126**(9): p. 951-9.
29. Pugh, T.D., T.D. Oberley, and R. Weindruch, *Dietary intervention at middle age: caloric restriction but not dehydroepiandrosterone sulfate increases lifespan and lifetime cancer incidence in mice*. Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1642-8.
30. Colman, R.J., et al., *Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys*. Science, 2009. **325**(5937): p. 201-4.
31. Mattison, J.A., et al., *Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 318-21.
32. Maxwell, L.C., C.S. Enwemeka, and G. Fernandes, *Effects of exercise and food restriction on rat skeletal muscles*. Tissue Cell, 1992. **24**(4): p. 491-8.
33. Anderson, R.M., D. Shanmuganayagam, and R. Weindruch, *Caloric restriction and aging: studies in mice and monkeys*. Toxicol Pathol, 2009. **37**(1): p. 47-51.
34. Duan, W. and M.P. Mattson, *Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease*. J Neurosci Res, 1999. **57**(2): p. 195-206.
35. Zhu, H., Q. Guo, and M.P. Mattson, *Dietary restriction protects hippocampal neurons against the death-promoting action of a presenilin-1 mutation*. Brain Res, 1999. **842**(1): p. 224-9.
36. Ingram, D.K., et al., *Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice*. J Gerontol, 1987. **42**(1): p. 78-81.
37. Bagga, D., et al., *Effects of a very low fat, high fiber diet on serum hormones and menstrual function. Implications for breast cancer prevention*. Cancer, 1995. **76**(12): p. 2491-6.

38. Kolaja, K.L., K.A. Bunting, and J.E. Klaunig, *Inhibition of tumor promotion and hepatocellular growth by dietary restriction in mice*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(8): p. 1657-64.
39. Wheatley, K.E., et al., *Low-carbohydrate diet versus caloric restriction: effects on weight loss, hormones, and colon tumor growth in obese mice*. *Nutr Cancer*, 2008. **60**(1): p. 61-8.
40. Xie, L., et al., *Effects of dietary calorie restriction or exercise on the PI3K and Ras signaling pathways in the skin of mice*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(38): p. 28025-35.
41. Stewart, J.W., et al., *Prevention of mouse skin tumor promotion by dietary energy restriction requires an intact adrenal gland and glucocorticoid supplementation restores inhibition*. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(6): p. 1077-84.
42. Van Remmen, H., et al., *Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging*. *Physiol Genomics*, 2003. **16**(1): p. 29-37.
43. Aidoo, A., et al., *Effect of caloric restriction on Hprt lymphocyte mutation in aging rats*. *Mutat Res*, 2003. **527**(1-2): p. 57-66.
44. Hart, R.W. and A. Turturro, *Dietary restrictions and cancer*. *Environ Health Perspect*, 1997. **105 Suppl 4**: p. 989-92.
45. Dogan, S., et al., *Effects of high-fat diet and/or body weight on mammary tumor leptin and apoptosis signaling pathways in MMTV-TGF-alpha mice*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(6): p. R91.
46. Ablamunits, V., et al., *Susceptibility to induced and spontaneous carcinogenesis is increased in fatless A-ZIP/F-1 but not in obese ob/ob mice*. *Cancer Res*, 2006. **66**(17): p. 8897-902.
47. Grossmann, M.E., et al., *Balance of adiponectin and leptin modulates breast cancer cell growth*. *Cell Res*, 2008. **18**(11): p. 1154-6.
48. Ash, C.E. and B.J. Merry, *The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation*. *Mech Ageing Dev*, 2011. **132**(1-2): p. 43-54.
49. Merry, B.J., *Calorie restriction and age-related oxidative stress*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **908**: p. 180-98.
50. Merry, B.J., *Oxidative stress and mitochondrial function with aging--the effects of calorie restriction*. *Aging Cell*, 2004. **3**(1): p. 7-12.
51. Ramsey, J.J., M.E. Harper, and R. Weindruch, *Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **29**(10): p. 946-68.
52. Sohal, R.S., et al., *Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse*. *Mech Ageing Dev*, 1994. **74**(1-2): p. 121-33.
53. Sohal, R.S. and R. Weindruch, *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. *Science*, 1996. **273**(5271): p. 59-63.
54. Barja, G., *Free radicals and aging*. *Trends Neurosci*, 2004. **27**(10): p. 595-600.
55. Chen, J.J. and B.P. Yu, *Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction*. *Aging (Milano)*, 1996. **8**(5): p. 334-40.

56. Cabelof, D.C., et al., *Caloric restriction promotes genomic stability by induction of base excision repair and reversal of its age-related decline*. DNA Repair (Amst), 2003. **2**(3): p. 295-307.
57. Lapointe, J. and S. Hekimi, *When a theory of aging ages badly*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(1): p. 1-8.
58. Laganier, S. and B.P. Yu, *Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes*. Mech Ageing Dev, 1989. **48**(3): p. 207-19.
59. Laganier, S. and B.P. Yu, *Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction*. Gerontology, 1993. **39**(1): p. 7-18.
60. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, 1972. **175**(4023): p. 720-31.
61. Innis, S.M., *Essential fatty acids in growth and development*. Prog Lipid Res, 1991. **30**(1): p. 39-103.
62. Riella, M.C., et al., *Essential fatty acid deficiency in human adults during total parenteral nutrition*. Ann Intern Med, 1975. **83**(6): p. 786-9.
63. Sprecher, H. and S.K. Sankarap, *The organic synthesis of unsaturated fatty acids*. Prog Lipid Res, 1981. **20**: p. 769-71.
64. Brenner, R.R., *The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals*. Mol Cell Biochem, 1974. **3**(1): p. 41-52.
65. Lands, W.E., A. Morris, and B. Libelt, *Quantitative effects of dietary polyunsaturated fats on the composition of fatty acids in rat tissues*. Lipids, 1990. **25**(9): p. 505-16.
66. Garg, M.L., et al., *Delta 6-desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or omega 3 fatty acids*. Biochem J, 1988. **249**(2): p. 351-6.
67. Jump, D.B., *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8755-8.
68. Chambaz, J., et al., *Essential fatty acid uptake and esterification in primary culture of rat hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 1986. **878**(3): p. 310-9.
69. Leyton, J., P.J. Drury, and M.A. Crawford, *Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat*. Br J Nutr, 1987. **57**(3): p. 383-93.
70. Hagve, T.A. and B.O. Christophersen, *Effect of dietary fats on arachidonic acid and eicosapentaenoic acid biosynthesis and conversion to C22 fatty acids in isolated rat liver cells*. Biochim Biophys Acta, 1984. **796**(2): p. 205-17.
71. Hagve, T.A. and B.O. Christophersen, *Evidence for peroxisomal retroconversion of adrenic acid (22:4(n-6)) and docosahexaenoic acids (22:6(n-3)) in isolated liver cells*. Biochim Biophys Acta, 1986. **875**(2): p. 165-73.
72. Patterson, E., et al., *Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids*. J Nutr Metab, 2012. **2012**: p. 539426.
73. Kremmyda, L.S., et al., *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2011. **155**(3): p. 195-218.
74. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1193-226.

75. Izumi, T., et al., *Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction*. J Biochem, 2002. **132**(1): p. 1-6.
76. Pulichino, A.M., et al., *Prostacyclin antagonism reduces pain and inflammation in rodent models of hyperalgesia and chronic arthritis*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **319**(3): p. 1043-50.
77. Kojima, F., S. Kato, and S. Kawai, *Prostaglandin E synthase in the pathophysiology of arthritis*. Fundam Clin Pharmacol, 2005. **19**(3): p. 255-61.
78. Arima, M. and T. Fukuda, *Prostaglandin D(2) and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma*. Korean J Intern Med, 2011. **26**(1): p. 8-18.
79. Schmitz, G. and J. Ecker, *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. Prog Lipid Res, 2008. **47**(2): p. 147-55.
80. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
81. Clarke, P.G. and S. Clarke, *Nineteenth century research on cell death*. Exp Oncol, 2012. **34**(3): p. 139-45.
82. Clarke, P.G. and S. Clarke, *Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena*. Anat Embryol (Berl), 1996. **193**(2): p. 81-99.
83. Kerr, J.F., *History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 471-4.
84. Horvitz, H.R. and J.E. Sulston, *Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1980. **96**(2): p. 435-54.
85. Horvitz, H.R. and J.E. Sulston, *"Joy of the worm"*. Genetics, 1990. **126**(2): p. 287-92.
86. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
87. Majno, G. and I. Joris, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
88. Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.
89. Gorman, A.M., et al., *Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(3): p. 306-16.
90. Wu, B.X., C.J. Clarke, and Y.A. Hannun, *Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses*. Neuromolecular Med, 2010. **12**(4): p. 320-30.
91. Crawford, E.D. and J.A. Wells, *Caspase substrates and cellular remodeling*. Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 1055-87.
92. Khan, A.R. and M.N. James, *Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 815-36.
93. Thornberry, N.A., et al., *A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis*. J Biol Chem, 1997. **272**(29): p. 17907-11.
94. Wachmann, K., et al., *Activation and specificity of human caspase-10*. Biochemistry, 2010. **49**(38): p. 8307-15.
95. Zhao, Y., X. Sui, and H. Ren, *From procaspase-8 to caspase-8: revisiting structural functions of caspase-8*. J Cell Physiol, 2010. **225**(2): p. 316-20.

96. Jost, P.J., et al., *XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis*. Nature, 2009. **460**(7258): p. 1035-9.
97. Barbero, S., et al., *Identification of a critical tyrosine residue in caspase 8 that promotes cell migration*. J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 13031-4.
98. Ayyash, M., H. Tamimi, and Y. Ashhab, *Developing a powerful in silico tool for the discovery of novel caspase-3 substrates: a preliminary screening of the human proteome*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 14.
99. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
100. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
101. Nagase, H., et al., *Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 142-3.
102. McIlroy, D., et al., *An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes*. Genes Dev, 2000. **14**(5): p. 549-58.
103. Hail, N., Jr., et al., *Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys*. Apoptosis, 2006. **11**(6): p. 889-904.
104. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 375-429.
105. Lautier, D., et al., *Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism*. Mol Cell Biochem, 1993. **122**(2): p. 171-93.
106. Smulson, M.E., et al., *Roles of poly(ADP-ribosylation) and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic stability and functions of p53 and E2F-1*. Adv Enzyme Regul, 2000. **40**: p. 183-215.
107. Adrain, C., et al., *Caspase-dependent inactivation of proteasome function during programmed cell death in Drosophila and man*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36923-30.
108. Sun, X.M., et al., *Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis*. Mol Cell, 2004. **14**(1): p. 81-93.
109. Wang, X.H., et al., *Caspase-3 cleaves specific 19 S proteasome subunits in skeletal muscle stimulating proteasome activity*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21249-57.
110. Hornle, M., et al., *Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis*. Oncogene, 2011. **30**(5): p. 575-87.
111. Fischer, U., R.U. Janicke, and K. Schulze-Osthoff, *Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 76-100.
112. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
113. Lamkanfi, M. and T.D. Kanneganti, *Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(1): p. 21-4.
114. Orth, K., et al., *The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16443-6.
115. Ruchaud, S., et al., *Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation*. EMBO J, 2002. **21**(8): p. 1967-77.

116. Graham, R.K., D.E. Ehrnhoefer, and M.R. Hayden, *Caspase-6 and neurodegeneration*. Trends Neurosci, 2011. **34**(12): p. 646-56.
117. Chipuk, J.E., et al., *The BCL-2 family reunion*. Mol Cell, 2010. **37**(3): p. 299-310.
118. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 440-2.
119. Cheng, E.H., et al., *BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis*. Mol Cell, 2001. **8**(3): p. 705-11.
120. Green, D.R. and G.I. Evan, *A matter of life and death*. Cancer Cell, 2002. **1**(1): p. 19-30.
121. Bouillet, P., et al., *Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim*. Dev Cell, 2001. **1**(5): p. 645-53.
122. Edlich, F., et al., *Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol*. Cell, 2011. **145**(1): p. 104-16.
123. Chipuk, J.E., et al., *Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis*. Science, 2004. **303**(5660): p. 1010-4.
124. Lalier, L., et al., *Prostaglandins antagonistically control Bax activation during apoptosis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(3): p. 528-37.
125. Kutuk, O. and A. Letai, *Regulation of Bcl-2 family proteins by posttranslational modifications*. Curr Mol Med, 2008. **8**(2): p. 102-18.
126. Tondera, D., et al., *SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion*. EMBO J, 2009. **28**(11): p. 1589-600.
127. Yethon, J.A., et al., *Interaction with a membrane surface triggers a reversible conformational change in Bax normally associated with induction of apoptosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(49): p. 48935-41.
128. Antonsson, B., et al., *Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria*. Biochem J, 2000. **345 Pt 2**: p. 271-8.
129. Lovell, J.F., et al., *Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax*. Cell, 2008. **135**(6): p. 1074-84.
130. Kuwana, T., et al., *Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane*. Cell, 2002. **111**(3): p. 331-42.
131. Zaltsman, Y., et al., *MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 553-62.
132. Martinou, J.C. and R.J. Youle, *Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics*. Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 92-101.
133. Dewson, G., et al., *To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions*. Mol Cell, 2008. **30**(3): p. 369-80.
134. Motoyama, N., et al., *Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1506-10.
135. Rinckenberger, J.L., et al., *Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 23-7.
136. Bratton, S.B. and G.S. Salvesen, *Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 19): p. 3209-14.
137. Garrido, C., et al., *Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria*. Cell Death Differ, 2006. **13**(9): p. 1423-33.

138. Kinnally, K.W. and B. Antonsson, *A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis*. *Apoptosis*, 2007. **12**(5): p. 857-68.
139. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. *Science*, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
140. Kokoszka, J.E., et al., *The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore*. *Nature*, 2004. **427**(6973): p. 461-5.
141. Dejean, L.M., et al., *Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(5): p. 2424-32.
142. Guo, L., et al., *Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(5): p. C1109-17.
143. Nakagawa, T., et al., *Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death*. *Nature*, 2005. **434**(7033): p. 652-8.
144. Antonsson, B., et al., *Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(15): p. 11615-23.
145. Dejean, L.M., et al., *Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(2): p. 191-201.
146. Suzuki, M., R.J. Youle, and N. Tjandra, *Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization*. *Cell*, 2000. **103**(4): p. 645-54.
147. Murphy, R.C., E. Schneider, and K.W. Kinnally, *Overexpression of Bcl-2 suppresses the calcium activation of a mitochondrial megachannel*. *FEBS Lett*, 2001. **497**(2-3): p. 73-6.
148. Roucou, X., et al., *Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes*. *Biochem J*, 2002. **363**(Pt 3): p. 547-52.
149. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. *Science*, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
150. Arnoult, D., et al., *Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization*. *EMBO J*, 2003. **22**(17): p. 4385-99.
151. Adrain, C., E.M. Creagh, and S.J. Martin, *Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2*. *EMBO J*, 2001. **20**(23): p. 6627-36.
152. Munoz-Pinedo, C., et al., *Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(31): p. 11573-8.
153. Stoica, B.A., et al., *Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins*. *Mol Cell Neurosci*, 2005. **29**(3): p. 355-71.
154. Scorrano, L., et al., *A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis*. *Dev Cell*, 2002. **2**(1): p. 55-67.
155. Zamzami, N. and G. Kroemer, *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(1): p. 67-71.
156. Tait, S.W. and D.R. Green, *Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(9): p. 621-32.
157. Westphal, D., et al., *Molecular biology of Bax and Bak activation and action*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(4): p. 521-31.

158. Hao, Z., et al., *Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis*. Cell, 2005. **121**(4): p. 579-91.
159. Yuan, S., et al., *Structure of an apoptosome-procaspase-9 CARD complex*. Structure, 2010. **18**(5): p. 571-83.
160. Bratton, S.B., et al., *Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 998-1009.
161. Malladi, S., et al., *The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer*. EMBO J, 2009. **28**(13): p. 1916-25.
162. Dubrez-Daloz, L., A. Dupoux, and J. Cartier, *IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins*. Cell Cycle, 2008. **7**(8): p. 1036-46.
163. Holcik, M. and R.G. Korneluk, *XIAP, the guardian angel*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(7): p. 550-6.
164. Harlin, H., et al., *Characterization of XIAP-deficient mice*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3604-8.
165. Shi, Y.H., et al., *Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence*. Hepatology, 2008. **48**(2): p. 497-507.
166. Potts, P.R., et al., *Critical function of endogenous XIAP in regulating caspase activation during sympathetic neuronal apoptosis*. J Cell Biol, 2003. **163**(4): p. 789-99.
167. Potts, M.B., et al., *Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 925-30.
168. Deveraux, Q.L., et al., *Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases*. EMBO J, 1999. **18**(19): p. 5242-51.
169. Du, C., et al., *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell, 2000. **102**(1): p. 33-42.
170. Chai, J., et al., *Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 855-62.
171. Martinez-Ruiz, G., et al., *Role of Smac/DIABLO in cancer progression*. J Exp Clin Cancer Res, 2008. **27**: p. 48.
172. Vande Walle, L., M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, *The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 453-60.
173. Gray, C.W., et al., *Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response*. Eur J Biochem, 2000. **267**(18): p. 5699-710.
174. Strauss, K.M., et al., *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(15): p. 2099-111.
175. Arya, R., M. Mallik, and S.C. Lakhotia, *Heat shock genes - integrating cell survival and death*. J Biosci, 2007. **32**(3): p. 595-610.
176. Samali, A. and S. Orrenius, *Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis*. Cell Stress Chaperones, 1998. **3**(4): p. 228-36.
177. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(3): p. 433-42.
178. Beere, H.M., *Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2633-9.

179. Kim, H.P., D. Morse, and A.M. Choi, *Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies*. Expert Opin Ther Targets, 2006. **10**(5): p. 759-69.
180. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
181. Gotoh, T., et al., *hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria*. Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 390-402.
182. Stankiewicz, A.R., et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38729-39.
183. Gabai, V.L., et al., *Hsp72 and stress kinase c-jun N-terminal kinase regulate the bid-dependent pathway in tumor necrosis factor-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(10): p. 3415-24.
184. Mosser, D.D., et al., *The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7146-59.
185. Beere, H.M., et al., *Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 469-75.
186. Saleh, A., et al., *Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(8): p. 476-83.
187. Lee, J.S., J.J. Lee, and J.S. Seo, *HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6634-41.
188. Beere, H.M., *"The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2641-51.
189. Wadhwa, R., et al., *Hsp70 family member, mot-2/mthsp70/GRP75, binds to the cytoplasmic sequestration domain of the p53 protein*. Exp Cell Res, 2002. **274**(2): p. 246-53.
190. Yang, J. and B. Li, *HSP70 silencing combined with AIF: a novel therapeutic approach for cancer*. Cancer Biol Ther, 2009. **8**(9): p. 799-800.
191. Seo, J.S., et al., *T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(2): p. 582-7.
192. Nylandsted, J., et al., *Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(14): p. 7871-6.
193. Sherman, M. and G. Multhoff, *Heat shock proteins in cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1113**: p. 192-201.
194. Garrido, C., et al., *HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors*. Cell Cycle, 2003. **2**(6): p. 579-84.
195. Gurbuxani, S., et al., *Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor*. Oncogene, 2003. **22**(43): p. 6669-78.
196. Gurbuxani, S., et al., *Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells*. Oncogene, 2001. **20**(51): p. 7478-85.
197. Otera, H., et al., *Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space*. EMBO J, 2005. **24**(7): p. 1375-86.

198. Miramar, M.D., et al., *NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. J Biol Chem, 2001. **276**(19): p. 16391-8.
199. Joza, N., et al., *AIF: not just an apoptosis-inducing factor*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1171**: p. 2-11.
200. Polster, B.M., et al., *Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria*. J Biol Chem, 2005. **280**(8): p. 6447-54.
201. Uren, R.T., et al., *Mitochondrial release of pro-apoptotic proteins: electrostatic interactions can hold cytochrome c but not Smac/DIABLO to mitochondrial membranes*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2266-74.
202. Cande, C., et al., *AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis*. Oncogene, 2004. **23**(8): p. 1514-21.
203. Wang, X., et al., *Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in Caenorhabditis elegans*. Science, 2002. **298**(5598): p. 1587-92.
204. Wang, X., et al., *C. elegans mitochondrial factor WAH-1 promotes phosphatidylserine externalization in apoptotic cells through phospholipid scramblase SCRM-1*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(5): p. 541-9.
205. Susin, S.A., et al., *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 441-6.
206. Daugas, E., et al., *Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis*. FASEB J, 2000. **14**(5): p. 729-39.
207. Cregan, S.P., V.L. Dawson, and R.S. Slack, *Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2785-96.
208. Varecha, M., et al., *Bioinformatic and image analyses of the cellular localization of the apoptotic proteins endonuclease G, AIF, and AMID during apoptosis in human cells*. Apoptosis, 2007. **12**(7): p. 1155-71.
209. Li, L.Y., X. Luo, and X. Wang, *Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria*. Nature, 2001. **412**(6842): p. 95-9.
210. Widlak, P., et al., *Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 48404-9.
211. David, K.K., et al., *EndoG is dispensable in embryogenesis and apoptosis*. Cell Death Differ, 2006. **13**(7): p. 1147-55.
212. Irvine, R.A., et al., *Generation and characterization of endonuclease G null mice*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(1): p. 294-302.
213. Zhang, J., et al., *Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 15782-7.
214. Lee, B.I., et al., *Early nuclear translocation of endonuclease G and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice*. Neurosci Lett, 2005. **386**(1): p. 23-7.
215. Nielsen, M., et al., *Nuclear translocation of endonuclease G in degenerating neurons after permanent middle cerebral artery occlusion in mice*. Exp Brain Res, 2009. **194**(1): p. 17-27.
216. Marzetti, E., et al., *Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle*. Mech Ageing Dev, 2008. **129**(9): p. 542-9.

217. Leeuwenburgh, C., et al., *Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(5): p. R1288-96.
218. Ishihara, Y. and N. Shimamoto, *Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress*. J Biol Chem, 2006. **281**(10): p. 6726-33.
219. Bajt, M.L., et al., *Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury*. Toxicol Sci, 2006. **94**(1): p. 217-25.
220. Ahn, C.H., et al., *Decreased expression of endonuclease G (EndoG), a pro-apoptotic protein, in hepatocellular carcinomas*. APMIS, 2008. **116**(6): p. 534-7.
221. Duan, R.D., *Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(3): p. 281-91.
222. Marathe, S., et al., *Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2648-58.
223. Grassme, H., et al., *Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation*. Oncogene, 2003. **22**(35): p. 5457-70.
224. Gulbins, E., *Regulation of death receptor signaling and apoptosis by ceramide*. Pharmacol Res, 2003. **47**(5): p. 393-9.
225. Jenkins, R.W., et al., *Regulated secretion of acid sphingomyelinase: implications for selectivity of ceramide formation*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35706-18.
226. Garcia-Ruiz, C., et al., *Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 197-208.
227. Zumbansen, M. and W. Stoffel, *Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(11): p. 3633-8.
228. Tomiuk, S., et al., *Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: functions in sphingolipid signaling?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3638-43.
229. Tepper, A.D., et al., *Effect of overexpression of a neutral sphingomyelinase on CD95-induced ceramide production and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 634-9.
230. Tonnetti, L., et al., *A role for neutral sphingomyelinase-mediated ceramide production in T cell receptor-induced apoptosis and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction*. J Exp Med, 1999. **189**(10): p. 1581-9.
231. Yabu, T., et al., *Identification of Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat stress-induced ceramide generation and apoptosis*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29971-82.
232. Tani, M. and Y.A. Hannun, *Neutral sphingomyelinase 2 is palmitoylated on multiple cysteine residues. Role of palmitoylation in subcellular localization*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 10047-56.
233. Tani, M. and Y.A. Hannun, *Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2*. FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1323-8.
234. Marchesini, N., C. Luberto, and Y.A. Hannun, *Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13775-83.

235. Stoffel, W., et al., *Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4554-9.
236. Stoffel, W., et al., *Neutral sphingomyelinase (SMPD3) deficiency causes a novel form of chondrodysplasia and dwarfism that is rescued by Col2A1-driven smpd3 transgene expression*. Am J Pathol, 2007. **171**(1): p. 153-61.
237. Kolmakova, A., et al., *Apolipoprotein C-I induces apoptosis in human aortic smooth muscle cells via recruiting neutral sphingomyelinase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(2): p. 264-9.
238. Goswami, R., et al., *Differential regulation of ceramide in lipid-rich microdomains (rafts): antagonistic role of palmitoyl:protein thioesterase and neutral sphingomyelinase 2*. J Neurosci Res, 2005. **81**(2): p. 208-17.
239. Levy, M., S.S. Castillo, and T. Goldkorn, *nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(3): p. 900-5.
240. Levy, M., et al., *Neutral sphingomyelinase 2 is activated by cigarette smoke to augment ceramide-induced apoptosis in lung cell death*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(1): p. L125-33.
241. Bezombes, C., et al., *Lysosomal sphingomyelinase is not solicited for apoptosis signaling*. FASEB J, 2001. **15**(2): p. 297-9.
242. Krut, O., et al., *Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13784-93.
243. Corcoran, C.A., et al., *Neutral sphingomyelinase-3 is a DNA damage and nongenotoxic stress-regulated gene that is deregulated in human malignancies*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(5): p. 795-807.
244. Nikolova-Karakashian, M.N. and M.B. Reid, *Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(9): p. 2501-17.
245. Mimeault, M., *New advances on structural and biological functions of ceramide in apoptotic/necrotic cell death and cancer*. FEBS Lett, 2002. **530**(1-3): p. 9-16.
246. Taha, T.A., T.D. Mullen, and L.M. Obeid, *A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1758**(12): p. 2027-36.
247. Lang, P.A., et al., *Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 6): p. 1233-43.
248. Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner, *Metabolism and function of coenzyme Q*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1660**(1-2): p. 171-99.
249. Villalba, J.M., et al., *Role of cytochrome b5 reductase on the antioxidant function of coenzyme Q in the plasma membrane*. Mol Aspects Med, 1997. **18 Suppl**: p. S7-13.
250. Martin, S.F., et al., *Neutral magnesium-dependent sphingomyelinase from liver plasma membrane: purification and inhibition by ubiquinol*. J Bioenerg Biomembr, 2001. **33**(2): p. 143-53.
251. Martin, S.F., et al., *Ubiquinol inhibition of neutral sphingomyelinase in liver plasma membrane: specific inhibition of the Mg(2+)-dependent enzyme and role of isoprenoid chain*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **297**(3): p. 581-6.

252. Navas, P. and J. Manuel Villalba, *Regulation of ceramide signaling by plasma membrane coenzyme Q reductases*. Methods Enzymol, 2004. **378**: p. 200-6.
253. Serini, S., et al., *Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer*. Apoptosis, 2009. **14**(2): p. 135-52.
254. Rose, D.P. and J.M. Connolly, *Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids*. Nutr Cancer, 2000. **37**(2): p. 119-27.
255. Monjazeb, A.M., et al., *Arachidonic acid-induced gene expression in colon cancer cells*. Carcinogenesis, 2006. **27**(10): p. 1950-60.
256. Calder, P.C., *n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: evidence explained and mechanisms explored*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(1): p. 1-11.
257. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505S-1519S.
258. Boudrault, C., R.P. Bazinet, and D.W. Ma, *Experimental models and mechanisms underlying the protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in Alzheimer's disease*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(1): p. 1-10.
259. Pfrommer, C.A., W. Erl, and P.C. Weber, *Docosahexaenoic acid induces ciap1 mRNA and protects human endothelial cells from stress-induced apoptosis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(6): p. H2178-86.
260. Heimli, H., et al., *Eicosapentaenoic acid promotes apoptosis in Ramos cells via activation of caspase-3 and -9*. Lipids, 2002. **37**(8): p. 797-802.
261. Arita, K., et al., *Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(7): p. 821-8.
262. Narayanan, B.A., N.K. Narayanan, and B.S. Reddy, *Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells*. Int J Oncol, 2001. **19**(6): p. 1255-62.
263. Danbara, N., et al., *Conjugated docosahexaenoic acid is a potent inducer of cell cycle arrest and apoptosis and inhibits growth of colo 201 human colon cancer cells*. Nutr Cancer, 2004. **50**(1): p. 71-9.
264. Llor, X., et al., *The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes*. Clin Nutr, 2003. **22**(1): p. 71-9.
265. Calviello, G., et al., *Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil*. Cancer Chemother Pharmacol, 2005. **55**(1): p. 12-20.
266. Wu, M., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate breast cancer growth through activation of a neutral sphingomyelinase-mediated pathway*. Int J Cancer, 2005. **117**(3): p. 340-8.
267. Siddiqui, R.A., et al., *Cell-cycle arrest in Jurkat leukaemic cells: a possible role for docosahexaenoic acid*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 2): p. 621-9.
268. McMurray, D.N., C.A. Jolly, and R.S. Chapkin, *Effects of dietary n-3 fatty acids on T cell activation and T cell receptor-mediated signaling in a murine model*. J Infect Dis, 2000. **182 Suppl 1**: p. S103-7.
269. Bazan, N.G., *The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling*. Cell Mol Neurobiol, 2006. **26**(4-6): p. 901-13.
270. Palmer, J.W., B. Tandler, and C.L. Hoppel, *Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: effects of procedural manipulations*. Arch Biochem Biophys, 1985. **236**(2): p. 691-702.

271. Baumgartner, R.N., et al., *Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico*. Am J Epidemiol, 1998. **147**(8): p. 755-63.
272. Marzetti, E., et al., *Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty - a mini-review*. Gerontology, 2012. **58**(2): p. 99-106.
273. Metter, E.J., et al., *Skeletal muscle strength as a predictor of all-cause mortality in healthy men*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2002. **57**(10): p. B359-65.
274. Larsson, L., B. Sjodin, and J. Karlsson, *Histochemical and biochemical changes in human skeletal muscle with age in sedentary males, age 22--65 years*. Acta Physiol Scand, 1978. **103**(1): p. 31-9.
275. McKiernan, S.H., et al., *Early-onset calorie restriction conserves fiber number in aging rat skeletal muscle*. FASEB J, 2004. **18**(3): p. 580-1.
276. Lexell, J., *Evidence for nervous system degeneration with advancing age*. J Nutr, 1997. **127**(5 Suppl): p. 1011S-1013S.
277. Conboy, I.M., et al., *Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 760-4.
278. Carlson, B.M. and J.A. Faulkner, *Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery*. Am J Physiol, 1989. **256**(6 Pt 1): p. C1262-6.
279. Degens, H., *Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2007. **7**(3): p. 246-52.
280. Morse, C.I., et al., *In vivo physiological cross-sectional area and specific force are reduced in the gastrocnemius of elderly men*. J Appl Physiol, 2005. **99**(3): p. 1050-5.
281. Lowe, D.A., et al., *Muscle activity and aging affect myosin structural distribution and force generation in rat fibers*. J Appl Physiol, 2004. **96**(2): p. 498-506.
282. Syrový, I. and Z. Hodný, *Non-enzymatic glycosylation of myosin: effects of diabetes and ageing*. Gen Physiol Biophys, 1992. **11**(3): p. 301-7.
283. Romanello, V., et al., *Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy*. EMBO J, 2010. **29**(10): p. 1774-85.
284. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
285. Gomes, M.D., et al., *Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14440-5.
286. Sandri, M., et al., *Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy*. Cell, 2004. **117**(3): p. 399-412.
287. Mammucari, C., et al., *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. Cell Metab, 2007. **6**(6): p. 458-71.
288. Dirks, A. and C. Leeuwenburgh, *Apoptosis in skeletal muscle with aging*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(2): p. R519-27.
289. Dirks, A.J. and C. Leeuwenburgh, *Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(1): p. 27-39.
290. Phillips, T. and C. Leeuwenburgh, *Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 668-70.

291. Chung, L. and Y.C. Ng, *Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1762**(1): p. 103-9.
292. Marzetti, E., et al., *Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle*. *Free Radic Biol Med*, 2008. **44**(2): p. 160-8.
293. Marzetti, E., et al., *Effects of short-term GH supplementation and treadmill exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. **294**(2): p. R558-67.
294. Marzetti, E., et al., *Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction*. *Mech Ageing Dev*, 2009. **130**(4): p. 272-80.
295. Seo, A.Y., et al., *Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences*. *Aging Cell*, 2008. **7**(5): p. 706-16.
296. Wohlgemuth, S.E., et al., *Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging: effects of calorie restriction and life-long exercise*. *Exp Gerontol*, 2010. **45**(2): p. 138-48.
297. Siu, P.M., *Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging*. *Med Sci Sports Exerc*, 2009. **41**(10): p. 1876-86.
298. Du, J., et al., *Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(1): p. 115-23.
299. Argiles, J.M., F.J. Lopez-Soriano, and S. Busquets, *Apoptosis signalling is essential and precedes protein degradation in wasting skeletal muscle during catabolic conditions*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008. **40**(9): p. 1674-8.
300. Alway, S.E., et al., *Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **283**(1): p. C66-76.
301. Song, W., H.B. Kwak, and J.M. Lawler, *Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(3-4): p. 517-28.
302. Pistilli, E.E., P.M. Siu, and S.E. Alway, *Molecular regulation of apoptosis in fast plantaris muscles of aged rats*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006. **61**(3): p. 245-55.
303. Siu, P.M., E.E. Pistilli, and S.E. Alway, *Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005. **289**(4): p. R1015-26.
304. Baker, D.J. and R.T. Hepple, *Elevated caspase and AIF gene expression correlate with progression of sarcopenia during aging in male F344BN rats*. *Exp Gerontol*, 2006. **41**(11): p. 1149-56.
305. Rice, K.M. and E.R. Blough, *Sarcopenia-related apoptosis is regulated differently in fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/N x BN rat model*. *Mech Ageing Dev*, 2006. **127**(8): p. 670-9.
306. Chabi, B., et al., *Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle*. *Aging Cell*, 2008. **7**(1): p. 2-12.
307. Braga, M., et al., *Involvement of oxidative stress and caspase 2-mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice*. *Apoptosis*, 2008. **13**(6): p. 822-32.

308. Tamilselvan, J., et al., *Age-dependent upregulation of p53 and cytochrome c release and susceptibility to apoptosis in skeletal muscle fiber of aged rats: role of carnitine and lipoic acid*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(12): p. 1656-69.
309. Talarmin, H., et al., *The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(9): p. 6003-11.
310. Forner, A., J.M. Llovet, and J. Bruix, *Hepatocellular carcinoma*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1245-55.
311. Asahina, Y., et al., *Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2010. **52**(2): p. 518-27.
312. Bruno, S., et al., *Sustained virological response to interferon-alpha is associated with improved outcome in HCV-related cirrhosis: a retrospective study*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 579-87.
313. Chakraborty, J.B., F. Oakley, and M.J. Walsh, *Mechanisms and biomarkers of apoptosis in liver disease and fibrosis*. Int J Hepatol, 2012. **2012**: p. 648915.
314. Takehara, T., et al., *Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas*. Hepatology, 2001. **34**(1): p. 55-61.
315. Sieghart, W., et al., *Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy*. J Hepatol, 2006. **44**(1): p. 151-7.
316. Beerheide, W., et al., *Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-X(S) in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(1): p. 54-61.
317. Chen, G.G., et al., *Decreased expression of Bid in human hepatocellular carcinoma is related to hepatitis B virus X protein*. Eur J Cancer, 2001. **37**(13): p. 1695-702.
318. Fabregat, I., *Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(5): p. 513-20.
319. Shin, E.C., et al., *Expression of Fas-related genes in human hepatocellular carcinomas*. Cancer Lett, 1998. **134**(2): p. 155-62.
320. Okano, H., et al., *Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma*. Lab Invest, 2003. **83**(7): p. 1033-43.
321. Lee, S.H., et al., *Expression of Fas and Fas-related molecules in human hepatocellular carcinoma*. Hum Pathol, 2001. **32**(3): p. 250-6.
322. Du, J., et al., *Hepatitis B virus core protein inhibits TRAIL-induced apoptosis of hepatocytes by blocking DR5 expression*. Cell Death Differ, 2009. **16**(2): p. 219-29.
323. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 19-26.
324. Breuhahn, K., T. Longerich, and P. Schirmacher, *Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma*. Oncogene, 2006. **25**(27): p. 3787-800.
325. Llovet, J.M. and J. Bruix, *Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. **48**(4): p. 1312-27.
326. Horie, Y., et al., *Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas*. J Clin Invest, 2004. **113**(12): p. 1774-83.

327. Calvisi, D.F., et al., *Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2713-22.
328. Menke, T., et al., *Simultaneous detection of ubiquinol-10, ubiquinone-10, and tocopherols in human plasma microsomes and macrosamples as a marker of oxidative damage in neonates and infants*. Anal Biochem, 2000. **282**(2): p. 209-17.
329. Selman, C., et al., *Increased hepatic apoptosis during short-term caloric restriction is not associated with an enhancement in caspase levels*. Exp Gerontol, 2003. **38**(8): p. 897-903.
330. Selman, C., et al., *Short-term caloric restriction and regulatory proteins of apoptosis in heart, skeletal muscle and kidney of Fischer 344 rats*. Biogerontology, 2003. **4**(3): p. 141-7.
331. Payne, A.M., S.L. Dodd, and C. Leeuwenburgh, *Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space*. J Appl Physiol, 2003. **95**(6): p. 2554-62.
332. Lee, C.M., et al., *Influences of caloric restriction on age-associated skeletal muscle fiber characteristics and mitochondrial changes in rats and mice*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 182-91.
333. Gesing, A., et al., *Decreased expression level of apoptosis-related genes and/or proteins in skeletal muscles, but not in hearts, of growth hormone receptor knockout mice*. Exp Biol Med (Maywood), 2011. **236**(2): p. 156-68.
334. Arslan, S., et al., *Exercise-induced apoptosis of rat skeletal muscle and the effect of meloxicam*. Rheumatol Int, 2002. **21**(4): p. 133-6.
335. Podhorska-Okolow, M., et al., *Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1998. **24**(6): p. 518-31.
336. Cha, M.C. and P.J. Jones, *Energy restriction dilutes the changes related to dietary fat type in membrane phospholipid fatty acid composition in rats*. Metabolism, 2000. **49**(8): p. 977-83.
337. Lopez-Dominguez, J.A., et al., *Dietary fat modifies mitochondrial and plasma membrane apoptotic signaling in skeletal muscle of calorie-restricted mice*. Age (Dordr), 2012.
338. King, V.R., et al., *Omega-3 fatty acids improve recovery, whereas omega-6 fatty acids worsen outcome, after spinal cord injury in the adult rat*. J Neurosci, 2006. **26**(17): p. 4672-80.
339. Ge, Y., et al., *Gene transfer of the Caenorhabditis elegans n-3 fatty acid desaturase inhibits neuronal apoptosis*. J Neurochem, 2002. **82**(6): p. 1360-6.
340. Yuzefovych, L., G. Wilson, and L. Rachek, *Different effects of oleate vs. palmitate on mitochondrial function, apoptosis, and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells: role of oxidative stress*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **299**(6): p. E1096-105.
341. Weigert, C., et al., *Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 23942-52.
342. Magee, P., S. Pearson, and J. Allen, *The omega-3 fatty acid, eicosapentaenoic acid (EPA), prevents the damaging effects of tumour necrosis factor (TNF)-alpha during murine skeletal muscle cell differentiation*. Lipids Health Dis, 2008. **7**: p. 24.

343. Babcock, T., W.S. Helton, and N.J. Espat, *Eicosapentaenoic acid (EPA): an antiinflammatory omega-3 fat with potential clinical applications*. Nutrition, 2000. **16**(11-12): p. 1116-8.
344. Whitehouse, A.S., et al., *Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3604-9.
345. Pistilli, E.E., J.R. Jackson, and S.E. Alway, *Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle*. Apoptosis, 2006. **11**(12): p. 2115-26.
346. Nagaraju, K., et al., *The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5459-65.
347. Allen, D.L., et al., *Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb unweighting*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. C579-87.
348. Zhang, Y. and B. Herman, *Apoptosis and successful aging*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(6): p. 563-5.
349. Kim, J.H., et al., *Lifelong exercise and mild (8%) caloric restriction attenuate age-induced alterations in plantaris muscle morphology, oxidative stress and IGF-1 in the Fischer-344 rat*. Exp Gerontol, 2008. **43**(4): p. 317-29.
350. Cornachione, A.S., et al., *Characterization of fiber types in different muscles of the hindlimb in female weanling and adult Wistar rats*. Acta Histochem Cytochem, 2011. **44**(2): p. 43-50.
351. Ariano, M.A., R.B. Armstrong, and V.R. Edgerton, *Hindlimb muscle fiber populations of five mammals*. J Histochem Cytochem, 1973. **21**(1): p. 51-5.
352. Chen, Y., et al., *The influence of dietary lipid composition on skeletal muscle mitochondria from mice following 1 month of calorie restriction*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(11): p. 1121-31.
353. Izumiya, Y., et al., *Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice*. Cell Metab, 2008. **7**(2): p. 159-72.
354. Studenski, S.A., *Gait speed in hospitalized older people: comment on "assessing gait speed in acutely ill older patients admitted to an acute care for elders hospital unit"*. Arch Intern Med, 2012. **172**(4): p. 358-9.
355. Muskhelishvili, L., et al., *Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in livers of diet-restricted and ad libitum-fed B6C3F1 mice*. Am J Pathol, 1995. **147**(1): p. 20-4.
356. Higami, Y., et al., *Aging accelerates but life-long dietary restriction suppresses apoptosis-related Fas expression on hepatocytes*. Am J Pathol, 1997. **151**(3): p. 659-63.
357. Higami, Y., et al., *Susceptibility of hepatocytes to cell death induced by single administration of cycloheximide in young and old F344 rats. Effect of dietary restriction*. Mutat Res, 1996. **357**(1-2): p. 225-30.
358. Suh, Y., *Cell signaling in aging and apoptosis*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(8): p. 881-90.
359. Youssef, J.A., M. Bouziane, and M.Z. Badr, *Age-dependent effects of nongenotoxic hepatocarcinogens on liver apoptosis in vivo*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(3): p. 333-40.
360. Bello, R.I., et al., *Differential regulation of hepatic apoptotic pathways by dietary olive and sunflower oils in the aging rat*. Exp Gerontol, 2006. **41**(11): p. 1174-84.

361. Molpeceres, V., et al., *Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2007. **62**(7): p. 687-95.
362. Ando, K., et al., *Impact of aging and life-long calorie restriction on expression of apoptosis-related genes in male F344 rat liver*. Microsc Res Tech, 2002. **59**(4): p. 293-300.
363. Cao, S.X., et al., *Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10630-5.
364. Tresguerres, J.A., et al., *Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008. **108**(3-5): p. 318-26.
365. Puche, J.E., et al., *Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats*. Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2620-7.
366. Garcia-Fernandez, M., et al., *Liver mitochondrial dysfunction is reverted by insulin-like growth factor II (IGF-II) in aging rats*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 123.
367. Zhang, Y., E. Chong, and B. Herman, *Age-associated increases in the activity of multiple caspases in Fisher 344 rat organs*. Exp Gerontol, 2002. **37**(6): p. 777-89.
368. Kern, M.A., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition induces apoptosis signaling via death receptors and mitochondria in hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7059-66.
369. Frances, D.E., et al., *Cyclooxygenase-2 over-expression inhibits liver apoptosis induced by hyperglycemia*. J Cell Biochem, 2013. **114**(3): p. 669-80.
370. Volpes, R., et al., *Hepatic expression of type A and type B receptors for tumor necrosis factor*. J Hepatol, 1992. **14**(2-3): p. 361-9.
371. Kanzler, S. and P.R. Galle, *Apoptosis and the liver*. Semin Cancer Biol, 2000. **10**(3): p. 173-84.
372. Stehlik, C., et al., *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 211-6.
373. Papa, S., et al., *Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 22): p. 5197-208.
374. Hofer-Warbinek, R., et al., *Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 22064-8.
375. Lu, M., et al., *XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 689-702.
376. Braeuer, S.J., et al., *Constitutively activated nuclear factor-kappaB, but not induced NF-kappaB, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(10): p. 715-28.
377. Micheau, O., et al., *NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(16): p. 5299-305.
378. Schwabe, R.F. and D.A. Brenner, *Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(4): p. G583-9.

379. Arnoult, D., et al., *Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli*. J Cell Biol, 2002. **159**(6): p. 923-9.
380. Zhou, L.L., et al., *Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis*. Apoptosis, 2005. **10**(2): p. 289-99.
381. Li, W., et al., *An essential role for the Id1/PI3K/Akt/NFkB/survivin signalling pathway in promoting the proliferation of endothelial progenitor cells in vitro*. Mol Cell Biochem, 2012. **363**(1-2): p. 135-45.
382. Tracey, L., et al., *Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively*. J Pathol, 2005. **206**(2): p. 123-34.
383. Pavlyukov, M.S., et al., *Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation*. J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23296-307.
384. Ran, R., et al., *Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling*. Genes Dev, 2004. **18**(12): p. 1466-81.
385. Blackwell, B.N., et al., *Longevity, body weight, and neoplasia in ad libitum-fed and diet-restricted C57BL6 mice fed NIH-31 open formula diet*. Toxicol Pathol, 1995. **23**(5): p. 570-82.
386. James, S.J., et al., *Upregulation of apoptosis with dietary restriction: implications for carcinogenesis and aging*. Environ Health Perspect, 1998. **106 Suppl 1**: p. 307-12.
387. Grasl-Kraupp, B., et al., *Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(21): p. 9995-9.
388. Higami, Y., et al., *Effect of aging and dietary restriction on hepatocyte proliferation and death in male F344 rats*. Cell Tissue Res, 1997. **288**(1): p. 69-77.
389. Higami, Y., et al., *Dietary restriction reduces hepatocyte proliferation and enhances p53 expression but does not increase apoptosis in normal rats during development*. Cell Tissue Res, 2000. **299**(3): p. 363-9.
390. Spaulding, C.C., R.L. Walford, and R.B. Effros, *Calorie restriction inhibits the age-related dysregulation of the cytokines TNF-alpha and IL-6 in C3B10RF1 mice*. Mech Ageing Dev, 1997. **93**(1-3): p. 87-94.
391. Hambly, C., et al., *Repletion of TNFalpha or leptin in calorically restricted mice suppresses post-restriction hyperphagia*. Dis Model Mech, 2012. **5**(1): p. 83-94.
392. Kim, H.J., B.P. Yu, and H.Y. Chung, *Molecular exploration of age-related NF-kappaB/IKK downregulation by calorie restriction in rat kidney*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(10): p. 991-1005.
393. Kim, D.H., et al., *The activation of NF-kappaB through Akt-induced FOXO1 phosphorylation during aging and its modulation by calorie restriction*. Biogerontology, 2008. **9**(1): p. 33-47.
394. Malhi, H., M.E. Guicciardi, and G.J. Gores, *Hepatocyte death: a clear and present danger*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 1165-94.
395. Odaka, C. and T. Mizuochi, *Macrophages are involved in DNA degradation of apoptotic cells in murine thymus after administration of hydrocortisone*. Cell Death Differ, 2002. **9**(2): p. 104-12.

396. Watanabe, A., et al., *Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9*. *Hepatology*, 2007. **46**(5): p. 1509-18.
397. Kim, H.J., et al., *Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells*. *J Cell Physiol*, 2005. **204**(3): p. 881-8.
398. Corsetto, P.A., et al., *Effects of n-3 PUFAs on breast cancer cells through their incorporation in plasma membrane*. *Lipids Health Dis*, 2011. **10**: p. 73.
399. Latham, P., E.K. Lund, and I.T. Johnson, *Dietary n-3 PUFA increases the apoptotic response to 1,2-dimethylhydrazine, reduces mitosis and suppresses the induction of carcinogenesis in the rat colon*. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(4): p. 645-50.
400. Lim, K., et al., *Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking beta-catenin and cyclooxygenase-2*. *Mol Cancer Ther*, 2009. **8**(11): p. 3046-55.
401. Weber, A., et al., *Hepatocyte-specific deletion of the antiapoptotic protein myeloid cell leukemia-1 triggers proliferation and hepatocarcinogenesis in mice*. *Hepatology*, 2010. **51**(4): p. 1226-36.
402. Hikita, H., et al., *Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis*. *J Hepatol*, 2012. **57**(1): p. 92-100.
403. Augusto, V., et al., *Skeletal muscle fiber types in C56BL6J mice*. *Braz J Morphol Sci*, 2004. **21**(2): p 89-94.
404. Thomas, M. D. and Hunt, A. N., *Monitoring making membranes; what's unique about plasma membranes?* Biochemical Society Congress, Glasgow, UK, July 2006. Abstract #334